



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

**DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS EN
EL AIRE DE *Olea europaea* (Ole e 1) CUANTIFICACIÓN POR MÉTODOS
INMUNOLÓGICOS**

Tesis doctoral presentada por D. José Julio García Hernández

Directoras de esta tesis: Dra. D^a Stella Moreno Grau

Dra. D^a M^a Luisa Belén Elvira Rendueles

2010

Fuera del perro, el libro es el mejor amigo del hombre.
Dentro del perro, quizá esté muy oscuro para leer (*Groucho Marx*)
A mi perrita Luisa, q.e.d.
A mi esposa, hija y nieta.
A mis padres y hermanos.

Agradecimientos

Ha llegado la hora de la culminación de una ilusión que, desde siempre, me ha parecido imposible de conseguir y que gracias al apoyo de innumerables personas, totalmente desinteresadas, y cargadas de paciencia está próxima a hacerse realidad.

A mi esposa, por su ayuda directa y sufrida, en todos los campos, incluidos el de la recolección de muestras y el lingüístico.

Por supuesto, agradecer a mis padres la confianza que siempre han depositado en mí y, allá donde se encuentren, seguro siguen depositando. Sin su inconmensurable ayuda jamás podría haber llegado a este punto.

Agradecer a todo el departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Politécnica de Cartagena, y en particular a Stella Moreno y a Belén Elvira la oportunidad que me han ofrecido para realizar este trabajo y, por descontado, la paciencia que han demostrado conmigo.

A la empresa Bial-Aristegui de Bilbao y, dentro de ella a Juan Andrés Asturias y a todo el personal del laboratorio que tan amablemente compartió conmigo todo su conocimiento y amabilidad

Al personal del despacho de billetes de RENFE-Cartagena, así como a los vecinos del mismo edificio, que nunca mostraron cansancio aún a pesar de que todos los días tenían que molestarse en buscarme las llaves de la puerta de acceso a los captadores polínicos.

RESUMEN

Desde la más remota antigüedad se ha intuido que el origen de algunas enfermedades, entre las que están la rinoconjuntivitis y el asma alérgico, reside en ciertas partículas presentes en la atmósfera que respiramos. En el siglo XIX, el Dr. Blackley pudo establecer que la causa de la denominada "fiebre del heno" era el grano polen de gramíneas, desde entonces hasta nuestros días se ha utilizado el *Índice polínico* como indicador de la carga alérgica del aire.

El polen del olivo (*Olea europaea*), árbol perteneciente a la familia Oleaceae ha sido tradicionalmente descrito como uno de los principales responsables de alergias de tipo respiratorio, sobre todo en el área Mediterránea, asociadas a su cultivo y a su uso cada vez más frecuente como árbol ornamental. Según el informe *Alergológica 2005* en la región de Murcia es donde se registra la mayor prevalencia de pacientes con rinitis alérgica de España siendo el polen de olivo el segundo en importancia.

Posteriormente, se ha podido demostrar que, en algunas especies, las moléculas responsables de que individuos atópicos padezcan las afecciones típicas de una polinosis, son proteínas. El grano de polen es el transportador primario de estas moléculas, pero no el único. Además, en las últimas décadas se ha puesto de manifiesto la posibilidad de que estas moléculas puedan viajar en el aire en partículas de menor tamaño que el grano de polen. Todo ello unido a la falta de correlación entre los recuentos polínicos y los síntomas de los pacientes, señalados por algunos investigadores, ha llevado a plantear la necesidad de cuantificar la carga alérgica del aire como complemento a los recuentos aerobiológicos tradicionales.

Los objetivos principales de este estudio se han centrado en: caracterizar en nuestra atmósfera el comportamiento aerobiológico de *Olea*, definir su Periodo Principal de Polinización (PPP) y la presencia en este periodo de otros pólenes de importancia alérgica que pudieran ser causa de reacciones cruzadas; y, detectar y cuantificar su alérgeno mayor Ole e 1, comparando los resultados obtenidos con los recuentos de polen de *Olea* tradicionales.

Tras un paseo por toda la literatura existente en torno al polen y los alérgenos de *Olea europaea*, su origen, clasificación, estructura, escultura, propagación, etc,..., así como por las principales técnicas de captura, lectura, valoración y recuento de forma general y específica, se da un repaso de las técnicas inmunológicas y un breve estudio de la polinosis, y se detallan los materiales empleados y los métodos seguidos para la obtención de los resultados presentados. En el estudio se han utilizado captadores aerobiológicos de bajo volumen. Para la caracterización aerobiológica clásica se ha utilizado un captador de impacto activo tipo Hirst, mientras que para la identificación y cuantificación de Ole e 1 se ha utilizado un captador ciclónico Burkard. Las muestras para los recuentos de *Olea* se han procesado siguiendo las instrucciones de la Red Española de Aerobiología; Ole e 1 se ha cuantificado por técnicas inmunoanalíticas tras la extracción de las muestras.

En el capítulo siguiente se presentan los resultados obtenidos, procediendo a su discusión. Así, el estudio aerobiológico del tipo polínico *Olea* en Cartagena define su PPP dentro de la estación primaveral, con una duración que oscila entre los 60 y los 106 días. El polen de *Olea* representa el 13,35% del computo anual total, valor que pasa al 25,46% en el PPP, y sumado con el resto de taxones que comparten su PPP se recoge en ese periodo de tiempo el 50% del polen total anual. Comparten plenamente el PPP de *Olea* los tipos polínicos *Palmae*, *Plantago*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex* y *Zygophyllum*, otros tipos polínicos que coinciden con *Olea* durante su PPP son *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* y *Urticaceae*, aunque la primera presenta en Cartagena un pico más importante a finales de verano / principios de otoño y la segunda florece en nuestra área todo el año, aunque los mayores recuentos se dan en primavera. Se han definido para *Olea* en la ciudad de Cartagena los niveles umbrales, tanto en base a los datos aerobiológicos como a los datos publicados de prevalencia de la sensibilización a este tipo en la zona.

Se ha puesto en marcha la metodología de muestreo y cuantificación de aeroalérgenos de *Olea*, Ole e 1 y Ole e 2. El aeroalérgeno Ole e 2 se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica la mayor parte de los días de floración

de *Olea*, mientras que Ole e 1 se cuantifica en todas las muestras dentro de la floración de *Olea*. Por lo que proponemos que los alérgenos seleccionados en estos estudios deben ser mayoritarios. Durante el periodo en el que se encuentra *Olea* presente en el aire, se han obtenido cuantificaciones de su alérgeno Ole e 1 que suministran una información similar a la aportada por los recuentos tradicionales, por ello consideramos que la cuantificación en el aerosol atmosférico de la carga alérgica transportada puede ser una buena aproximación desde la aerobiología al conocimiento de su reactividad y respuesta, constituyendo datos de interés en los estudios epidemiológicos. Asimismo, se han encontrado concentraciones normalizadas del alérgeno Ole e 1 que pueden ser iguales, menores o mayores a las concentraciones normalizadas de la concentración de *Olea*, sin que podamos precisar si ese comportamiento es debido a causas meteorológicas, como la presencia de lluvias, o a factores intrínsecos del grano de polen, o factores ambientales que pudieran estar influyendo en este comportamiento.

Complementa la discusión el capítulo de conclusiones, en el que se recogen un total de nueve ideas básicas aportadas por el trabajo y se aportan las líneas de futuro en la investigación. La memoria finaliza con una extensa relación alfabética de toda la bibliografía que se ha utilizado para la realización del trabajo.

SUMMARY

Since the most ancient times, it has been suspected that the origin of a number of illnesses, for instance hay fever and asthma, lays in a certain kind of airborne particles that we breathe. In the 19th century, Dr. Blackley was able to establish that hay fever was caused by grass pollen grains and since then, the so-called “*Pollen Index*” has been used like an allergenic load quantifier barometer.

Olive pollen (*Olea europaea*), a tree belonging to the Oleaceae family, has traditionally been described as one of the main species being responsible for respiratory allergy problems in the Mediterranean area, because of its farming and its increasing use as an ornamental tree. According to Alergologica 2005, Murcia is the Spanish region where the higher prevalence of patients suffering allergic rhinitis has been recorded, setting olive pollen in the second place of importance.

Subsequently, it has been possible to demonstrate that, in some species, proteins are the molecules responsible for the fact that atopic human beings suffer from typical pollenosis conditions. The pollen grain is the primary transporter of this kind of molecules, but not the only one. Moreover, since the last decades, it has been highlighted the possibility that these molecules can travel in the air carried by other smaller particles different from the pollen grain. The abovementioned plus the lack of correlation between the pollen counts and the patient symptoms, indicated by some researchers, has driven to the need of using the air allergenic load as a complement to the usual aerobiological counts.

The most important objectives in this study have been focused in: depicting the aerobiological behaviour of *Olea* in our atmosphere, defining its Main Pollen Season (MPS) and the existence of other pollens with allergenic importance in this period, which could be the cause of cross reactions, and detecting and quantifying its main allergen, Ole e 1, comparing its results to the classical aerobiological counts.

After a stroll through the present and past literature of the pollen and allergens of *Olea europaea*, its origin, classification, structure, sculpture,

propagation, etc..., as well as through a general and specific review of the main traps, sampling, reading, count and valuation techniques, a brief pollenosis study and a review of immunological techniques is given. Afterwards, materials used and methods followed in order to obtain the given results are detailed. In this study, two low volume aerobiological traps have been used. For classical aerobiological characterization, a Hirst active impact trap has been used, whereas a Burkard ciclone trap has been utilized for identification and quantification of Ole e 1. The samples for *Olea* counts have been done following the directions of “Red Española de Aerobiología” and Ole e 1 has been quantified by means of immunological techniques after the sample extractions.

The results are written in the next chapter, followed by its discussion. So, the aerobiological study of the *Olea* pollen type in Cartagena defines its MPS in the spring season, lasting between 60 and 106 days. *Olea pollen* rise to 13,35% of the annual total count, being 25,46% in its MPS and, if we add the rest of the taxons that share its MPS, 50% of total annual count is reached. *Palmae*, *Plantago*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex* and *Zygophyllum* completely share *Olea*’s MPS. *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* and *Urticaceae* are coincident with *Olea* through its MPS, but the former has a more important peak by the end of the summer / beginning of the autumn in Cartagena while the latter flourishes the whole year in our zone, although higher counts are given in spring. The threshold levels for *Olea* have been defined in Cartagena, taking the aerobiological data into account, as well as the published prevalence data of sensibilization to this type in our zone.

Sampling and quantification methodology for *Olea* allergens, Ole e 1 and Ole e 2, has been started. Ole e 2 aeroallergen is under the detection limits of the method nearly the whole days of the *Olea*’s flowering, while Ole e 1 can be quantified in the whole samples through the *Olea*’s flowering. This is the reason why we propose that, in these kind of studies, the mayor allergens must be selected. Through the period that *Olea* is in the air, it has been recorded Ole e 1 quantifications which give us a similar information to that obtained from classical counts, and because of that we consider that the quantification of allergenic load

carried by atmospheric aerosol can be a good approximation from aerobiology to the knowledge of its reactivity and response, being data of interest in epidemiology. Likewise, standardized concentrations of Ole e 1 have been found which can be equal, lower or higher than standardized concentrations of *Olea* pollen, although we cannot precise whether this behaviour is because of the weather (rainfall), or because of intrinsic factors of the pollen grain or other environmental factors that could have an influence in this kind of behaviour. The discussion chapter is followed by the conclusions one, in which nine basic ideas and a future direction work have been given. This memory finishes with an alphabetical list of the whole bibliograpy used in this work.

1. ÍNDICES

1. Índices.

1.1. Índice de contenido

	Página
1. Índices.	1
1.1. Índice de contenido	1
1.2. Índice de figuras.....	7
1.3. Índice de tablas.....	11
2. Introducción	17
4. Antecedentes bibliográficos	33
4.1. Desarrollo histórico de la microbiología del aire.....	33
4.2. Aerobiología	39
4.2.1. La aerobiología y sus relaciones con otras disciplinas.....	39
4.2.2. Palinología	41
4.2.3. Estructuras reproductivas.....	41
4.2.3.1. Gimnospermas	41
4.2.3.2. Angiospermas	43
4.2.3.3. Partes de la flor	43
4.2.4. El grano de polen	44
4.2.4.1. Biología celular del polen.....	46
4.2.4.2. Localización celular de los alérgenos polínicos	48
4.2.4.3. Morfología de la pared celular y clasificación de los pólenes.....	48
4.2.4.3.1. Estructura de la pared celular	48
4.2.4.3.2. Escultura de la pared celular.....	49
4.2.4.3.3. Clasificación según polaridad.....	50
4.2.4.3.4. Clasificación en base a su forma.....	51
4.2.4.3.5. Clasificación en base a su tamaño	53
4.2.4.3.6. Clasificación en base a tipo y número de aperturas.....	53
4.2.4.4. Producción, descarga, transporte, dispersión y resuspensión del polen...	56
4.2.4.5. Estación polínica.....	63
4.2.4.5.1. Inicio del periodo de polinización.....	63
4.2.4.5.2. Período de polinización.....	65
4.2.4.6. Polinización y sus tipos	68

4.2.5. Métodos de captura.....	70
4.2.5.1. Tipos de captadores.....	70
4.2.5.1.1. Muestreadores de precipitación.-	71
4.2.5.1.2. Muestreadores por impacto.....	73
4.2.5.1.3. Muestreadores centrífugos.....	77
4.2.5.1.4. Muestreadores por filtración.....	79
4.2.5.1.5. Muestreadores biológicos.....	81
4.2.6. Identificación del polen	81
4.2.6.1. Polen completo.....	81
4.2.6.2. Detección de alérgenos.....	85
4.2.7. Oleaceas (Oleaceae)	90
4.2.7.1. Características botánicas y distribución	90
4.2.7.2. <i>Olea europaea</i>	93
4.2.7.3. Morfología polínica.....	96
4.2.8. Base inmunológica y molecular de la alergia. Breve introducción a la inmunología.....	96
4.2.8.1. Origen de la alergia	108
4.2.8.2. Mecanismo de desarrollo de polinosis	110
4.2.8.3. Antígenos.....	112
4.2.8.4. Alérgenos.....	113
4.2.8.4.1. Nomenclatura de alérgenos.....	115
4.2.8.4.2. Alérgenos. Caracterización.....	115
4.2.8.5. Aeroalérgenos	116
4.2.8.5.1. Aeroalérgenos. Características.....	116
4.2.8.6. Reactividad cruzada	120
4.2.8.7. Identificación de epitopos.....	123
4.2.8.8. Características intrínsecas de los alérgenos y su relación con la alergenicidad.....	123
4.2.8.9. Estructura de los alérgenos	125
4.2.8.10. Utilidad diagnóstica.....	128
4.2.8.11. Potencial terapéutico	128
4.2.8.12. Alérgenos polínicos.....	129

4.2.8.13. Fracciones alergénicas del polen de olivo	135
4.2.8.13.1. Ole e 1	137
4.2.8.13.2. Ole e 2	139
4.2.8.13.3. Ole e 3	140
4.2.8.13.4. Ole e 4 y Ole e 5	141
4.2.8.13.5. Ole e 6	142
4.2.8.13.6. Ole e 7	142
4.2.8.13.7. Ole e 8	143
4.2.8.13.8. Ole e 9	144
4.2.8.13.9. Ole e 10.....	145
4.2.8.13.10. Ole e 11.....	147
4.2.8.14. Alérgenos recombinantes. Aplicaciones. Ventajas	147
4.2.8.14.1. Diseño y producción de alérgenos recombinantes del polen del olivo	149
4.2.9. Polinosis.....	151
4.2.9.1. Polinosis en el area mediterránea.....	153
4.2.9.2. Diagnóstico	156
4.2.9.3. Pruebas cutáneas.	157
4.2.9.4. Pruebas sanguíneas.....	158
4.2.9.5. Tratamiento: evitar el alérgeno	159
4.2.9.6. Tratamiento farmacológico.....	159
4.2.9.7. Tratamiento inmunológico:	159
4.2.9.8. Tratamientos alternativos	160
5. Material y métodos.....	165
5.1. Métodos volumétricos de captación.....	165
5.1.1. Principio de captación por impacto activo.....	165
5.1.1.1. Mantenimiento del equipo: manual de calidad.....	167
5.1.1.2. Transporte de la muestra:	170
5.1.1.3. Preparación de la muestra para su análisis	170
5.1.2. Principio de captacion ciclónica en seco (bajo volumen): Burkard ciclón...	171
5.1.2.1. Recogida de las muestras:.....	173
5.2. Métodos de análisis	173

5.2.1. Identificación y recuento de los granos de polen.....	173
5.2.1.1. Montaje de las muestras diarias.....	173
5.2.1.2. Identificación microscópica de pólenes.....	176
5.2.1.3. Cálculo de las concentraciones de granos de polen método Hirst.....	178
5.2.1.4. Estación polínica: cálculo de los periodos principales de polinización de <i>Olea</i> años 2000-2007.....	180
5.2.2. Cuantificación de los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2 del polen de olivo.....	186
5.2.2.1.1. Extracción de los alérgenos de las muestras. Protocolo.....	187
5.2.2.1.2. Purificación de alérgenos Ole e 1 y Ole e 2.....	187
5.2.2.1.3. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales.....	188
5.2.2.1.4. Elisa doble fase. Protocolo.....	189
5.3. Tratamiento estadístico de los datos.....	190
6. Resultados.....	195
6.1. Datos aerobiológicos de <i>Olea europaea</i> en la atmósfera de Cartagena (Murcia) en el periodo 2000-2007.....	195
6.1.1. Evolución de <i>Olea</i> durante el periodo de estudio años 2000-2007.....	195
6.1.2. Variación anual de <i>Olea</i> y lluvias durante el periodo de estudio.....	195
6.1.3. Caracterización del Periodo Principal de polinización de <i>Olea</i> durante el periodo de estudio años 2000-2007.....	195
6.1.4. Niveles umbrales para el tipo polínico <i>Olea</i> en el bioaerosol de Cartagena. Valores anuales y durante el Periodo Principal de Polinización. Representatividad del taxón en el espectro polínico de la Ciudad.....	204
6.1.5. Presencia de otros taxones influyentes durante el Periodo Principal de Polinización de <i>Olea</i> : Evaluación de reactividad cruzada.....	208
6.2. Resultados cuantificación aeroalérgenos.....	221
6.2.1. Cuantificación de la profilina Ole e 2.....	221
6.2.2. Cuantificación de Ole e 1.....	222
6.2.2.1. Año 2003.....	222
6.2.2.2. Año 2004.....	224
6.2.2.3. Año 2005.....	225
6.2.2.4. Año 2006.....	226

6.2.2.5. Año 2007.	227
6.2.3. Recuentos de <i>Olea</i> y cuantificación de aeroalérgenos.	227
6.2.3.1. Recuentos de granos de polen y cuantificación de Ole e 2.	227
6.2.3.2. Recuentos de Olea y cuantificación de Ole e 1.	228
7. Discusión	237
8. Conclusiones	273
9. Bibliografía	281

1.2. Índice de figuras

Figura 4. 1 Unidades polínicas.....	45
Figura 4. 2 Esquema de los ejes de un grano de polen.....	51
Figura 4. 3: Aperturas granos de polen.	56
Figura 4. 4 Transporte del grano de polen.....	57
Figura 4. 5 Esquema de precipitador electrostático	72
Figura 4. 6 Foto Burkard 7 days	74
Figura 4. 7 Fotografía y esquema del impactador en cascada	75
Figura 4. 8 Impactador virtual.....	77
Figura 4. 9 Borboteador en cascada.	80
Figura 4. 10 Mecanismos de defensa	97
Figura 4. 11 Reconocimiento antigénico. Respuestas humoral y celular.....	98
Figura 4. 12 Unidad básica de inmunoglobulina.	101
Figura 4. 13 Inmunoglobulina, esquema.	102
Figura 4. 14 CDR y unión al epítipo.	104
Figura 4. 15 Micrografía electrónica del polen de olivo.	155
Figura 5. 1 Captador Hirst	167
Figura 5. 2 Esquema Burkard 7 days	168
Figura 5. 3 Aplicación de fluido de silicona sobre Melinex en el tambor.....	171
Figura 5. 4 Captador ciclónico Burkard	172
Figura 5. 5 Glicerogelatina sobre portaobjetos	175
Figura 5. 6 Sellado sobre portaobjetos y almacenamiento de muestras.....	175
Figura 5. 7 Polen tricolpado, tricolporado, trizonocolpado	177
Figura 5. 9 Granos de polen por unidad de volumen (P/m^3)	180
Figura 5. 10 Esquema técnica ELISA Sándwich	186
Figura 6. 1 Variación interanual de <i>Olea</i> . Polen total ($granos/m^3$ y día) y lluvia (mm) durante el periodo 2000-2007.	197
Figura 6. 2 Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2000	197
Figura 6. 3 Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución 2001	198
Figura 6. 4 Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2002	198
Figura 6. 5 Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2003.	199

Figura 6. 6	Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2004.....	199
Figura 6. 7	Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2005.....	200
Figura 6. 8	Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2006.....	200
Figura 6. 9	Concentraciones de <i>Olea</i> y precipitaciones. Evolución año 2007.....	201
Figura 6. 10	Número de días del Periodo Principal de Polinización.....	207
Figura 6. 11	Código de color que representa los taxones que comparten el PPP con <i>Olea</i> , <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	211
Figura 6. 12	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2000, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	213
Figura 6. 13	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2001, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	213
Figura 6. 14	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2002, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	214
Figura 6. 15	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2003, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	214
Figura 6. 16	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2004, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	215
Figura 6. 17	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2005, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	215
Figura 6. 18	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2006, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	216
Figura 6. 19	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2007, <i>Chenopodiaceae-Amaranthaceae</i> , <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Zygophyllum</i>	216

Figura 6. 20 Curva de calibración para la cuantificación de Ole e 2.	221
Figura 6. 21 Curva de calibración para la cuantificación de Ole e 1 en la muestras de 2003.	222
Figura 6. 22 Valores de los recuentos de los tipos polínicos <i>Olea</i> , <i>Urticaceae</i> y <i>Quercus</i> entre los días 15 de abril y 16 de junio de 2002, se señala con una elipse roja el intervalo de días en los que en las muestras para la cuantificación de aeroalérgenos se han encontrado valores por encima del límite de detección para la profilina Ole e 2.	228
Figura 6. 23 Valores normalizados de los recuentos de <i>Olea</i> y la cuantificación de Ole e 1 del año 2003, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.	229
Figura 6. 24 Valores normalizados de los recuentos de <i>Olea</i> y la cuantificación de Ole e 1 del año 2004, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.	229
Figura 6. 25 Valores normalizados de los recuentos de <i>Olea</i> y la cuantificación de Ole e 1 del año 2005, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.	230
Figura 6. 26 Valores normalizados de los recuentos de <i>Olea</i> y la cuantificación de Ole e 1 del año 2006, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.	230
Figura 6. 27 Valores normalizados de los recuentos de <i>Olea</i> y la cuantificación de Ole e 1 del año 2007, se muestran como barras las lluvias recogidas en mm.	231

1.3. Índice de tablas.

Tabla 4. 1 Nomenclatura polen según su polaridad	50
Tabla 4. 2 Clasificación polínica según simetría y polaridad	51
Tabla 4. 3 Clasificación del polen según la razón P/E.	52
Tabla 4. 4 Tipos de pólenes según longitud del eje mayor.....	53
Tabla 4. 5 Efecto del tamaño del material particulado sobre la eficiencia de los precipitadores electrostáticos	72
Tabla 4. 6 Características respuesta inmune específica.....	100
Tabla 4. 7 Conc. de inmunoglobulinas en suero adulto normal (mg/100mL).....	106
Tabla 4. 8 Principales funciones de las inmunoglobulinas.....	106
Tabla 4. 9 Diferencias entre respuestas inmunes	107
Tabla 4. 10 Valores normales de IgE	108
Tabla 4. 11 Tipos de alérgenos más frecuentes	114
Tabla 4. 12 Enfermedades alérgicas más frecuentes.....	114
Tabla 4. 13 Estructura de alérgenos. Clasificación según plegamiento.	127
Tabla 4. 14 Cómo demostrar que un alérgeno es causa de asma.....	152
Tabla 6. 1 Tablas valores acumulados anuales de <i>Olea</i> , Pólenes totales y lluvias durante los años 2000-2007. Porcentaje de representación de <i>Olea</i> frente al polen total.....	196
Tabla 6. 2 Datos del Periodo Principal de Polinización de <i>Olea</i> 2000-2007 calculados en base al <i>método Andersen yTorben (1991)</i>	202
Tabla 6. 3 Resultados del cálculo del Periodo Principal de Polinización (PPP ¹) de <i>Olea</i> en base al método de <i>Persson y Nilsson (1981)</i> combinado con el de <i>Jäger et al, (1996)</i>	203
Tabla 6. 4 Niveles umbrales de <i>Olea</i> propuestos por la REA	204
Tabla 6. 5 Niveles umbrales de <i>Olea</i> para Cartagena, calculados en base a Criterios estadísticos: percentiles 90, 95 y 99 durante el periodo en estudio 2000-2007.....	205
Tabla 6. 6 Valores umbrales <i>Olea</i> en granos/m ³ para Cartagena tras su análisis PPP.	205
Tabla 6. 7 Concentración acumulada anual de <i>Olea</i> y número de días en los que las concentraciones de <i>Olea</i> se encuentran en los rangos que se indican dentro del PPP.	205
Tabla 6. 8 Número de días en los que los niveles del taxón <i>Olea</i> se encuentra por debajo de 50 granos/m ³ , por encima de este valor o por encima de 100 granos/m ³	206

Tabla 6. 9	Porcentaje que representan los días en los que las concentraciones se encuentran en los rangos que se indican dentro del PPP de <i>Olea</i> .	206
Tabla 6. 10	Representación del taxón <i>Olea</i> frente al polen total en el Periodo Principal de Polinización. En la tabla se presenta para cada año la duración en días del PPP, y para ese periodo la cantidad acumulada de <i>Olea</i> y el total acumulado.	207
Tabla 6. 11	Concentración acumulada de <i>Olea</i> y los taxones más representativos en su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , Poaceae, <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , Urticaceae y <i>Zygophyllum</i> (granos/m ³) en los años completos o durante el PPP.	209
Tabla 6. 12	Concentraciones totales y representación porcentual de <i>Olea</i> y los taxones más representativos en su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , Poaceae, <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , Urticaceae y <i>Zygophyllum</i> , para los datos completos del periodo y para los datos registrados durante el PPP de <i>Olea</i> .	210
Tabla 6. 13	Taxones presentes en la atmósfera de Cartagena que tienen más de un Periodo de Polinización.	212
Tabla 6. 14	Valores de los Percentiles 90, 95 y 99 para <i>Olea</i> y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , Poaceae, <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , Urticaceae y <i>Zygophyllum</i> , granos/m ³ , para el conjunto de los datos del periodo 2000-2007.	217
Tabla 6. 15	Niveles de polen en la atmósfera de Cartagena calculados según criterios estadísticos para <i>Olea</i> y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , Poaceae, <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , Urticaceae y <i>Zygophyllum</i> , granos/m ³ , para el conjunto de los datos del periodo 2000-2007.	218
Tabla 6. 16	Correlaciones bivariadas de Pearson entre <i>Olea</i> y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , Poaceae, <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , Urticaceae y <i>Zygophyllum</i> , incluyendo en el análisis los recuentos correspondientes al PPP.	219
Tabla 6. 17	Correlaciones bivariadas de Pearson entre <i>Olea</i> y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, <i>Palmae</i> , <i>Platanus</i> , Poaceae, <i>Quercus</i> , <i>Rumex</i> , Urticaceae y <i>Zygophyllum</i> , incluyendo en el análisis los recuentos anuales completos.	220

Tabla 6. 18 Resultados de la cuantificación de Ole e 2, la tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de <i>Olea</i> y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 2.	222
Tabla 6. 19 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2003. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de <i>Olea</i> y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.....	223
Tabla 6. 20 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2004. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de <i>Olea</i> y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.....	224
Tabla 6. 21 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2005. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de <i>Olea</i> y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.....	225
Tabla 6. 22 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2006. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de <i>Olea</i> y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.....	226
Tabla 6. 23 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2007. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de <i>Olea</i> y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.....	227
Tabla 6. 24 Coeficientes de correlación de Pearson entre los recuentos en el bioaerosol de <i>Olea</i> , los recuentos totales, granos/m ³ de aire, y la cuantificación de Ole e 1, pg/m ³ . N, tamaño de la muestra, para cada uno de los años estudiados y el conjunto del periodo.....	232

2. INTRODUCCIÓN

2. Introducción

La aerobiología ha estado a lo largo del tiempo ligada íntimamente al estudio del material biológico alergénico aerotransportado, fundamentalmente los granos de polen, ya que fueron la primera causa conocida de alergia respiratoria y, en la actualidad, su importancia clínica es indiscutible.

En el siglo XIX, el Dr. Blackley pudo establecer que la causa de la denominada “fiebre del heno” era los granos de polen de gramíneas, tras detectar con un colector ideado al efecto, su presencia en el aire de Manchester y observar que la exacerbación de los síntomas en sus pacientes coincidía con los períodos de mayor captación de dichos pólenes.

El estudio del aerosol atmosférico es uno de los campos básicos en los estudios ambientales y puede abordarse desde diversas perspectivas y con objetivos diferentes. El polen puede ser un buen modelo para estudiar la interrelación entre contaminación atmosférica y las enfermedades respiratorias alérgicas (Aránguez *et al*, 1999) (Ballester, 2005).

Según el informe “Alergológica 1992” de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), el impacto de los aeroalérgenos sobre la salud pública tiende a variar de unas regiones a otras dependiendo de su variabilidad aerobiológica, meteorológica, nivel de exposición a contaminantes atmosféricos locales y susceptibilidad individual.

Un reciente estudio realizado por la SEAIC sobre la enfermedad alérgica en España (Alergológica 2005) indica que el 21,5% de la población sufre rinitis alérgica, siendo los síntomas alérgicos más comunes la rinoconjuntivitis (55,5%) seguido del asma (28%). En el estudio, la Región de Murcia es la que registra el mayor número de casos de Rinoconjuntivitis (68,9%) y asma alérgico (42,6%), siendo los aeroalérgenos (pólenes, ácaros, epitelios de animales y esporas de hongos) la causa principal. Como pólenes más relevantes causales de rinoconjuntivitis destacan las gramíneas (34,8%) seguido del polen del olivo

(29,7%), *Chenopodium* (9,5%) *Cupressus* (9,2%) *Artemisia* (6,8%) y *Parietaria* (6,8%)

Del total de personas con rinoconjuntivitis, el 40% reaccionan a varios tipos de polen (polisensibilizados), lo que hace que los síntomas alérgicos se alarguen en el tiempo y los pacientes sufran crisis de asma alérgico (20%), según el informe “Alergológica 2005” de la SEAIC.

Desde entonces hasta nuestros días, los avances tecnológicos aplicados a la aerobiología y en concreto a la palinología, han permitido un mejor y más exhaustivo conocimiento de esta disciplina, teniendo como fin último la aplicación práctica en un más preciso diagnóstico y en consecuencia, más adecuado tratamiento del paciente polínico (Zapata, 2003).

Chamorro encontró en 2003 que la sintomatología alérgica producida por polen de *Platanus* se caracteriza por tener una aparición muy brusca debido a la especial forma de polinización de esta planta pero que, en contraste con esto, al final de la estación los síntomas persisten durante una semana a pesar de que no existen niveles de polen.

La alergenidad del polen es debida a que los granos se depositan sobre las mucosas y allí liberan sus productos. Los estudios aerodinámicos realizados dejan ver que las partículas con un tamaño aerodinámico mayor de 10 μm quedan atrapadas en las vías superiores. De este modo, se puede considerar que la aparición del asma bronquial estaría causada más bien por el polen acumulado, que no por la exposición diaria al mismo, hecho que también explicaría el desfase temporal entre la aparición de síntomas de rinoconjuntivitis y asma (Valero *et al*, 2006)

Beggs, en 1998 publica un detallado estudio en el que pone en evidencia la discordancia entre estudios que indican un incremento de asma asociado a niveles polínicos altos y otros estudios con resultados contrarios, lo que pone en duda la efectividad del conteo de polen para predecir crisis o epidemias de asma y sugiere la necesidad de usar métodos que midan directamente la concentración de

los antígenos polínicos alergénicos libres en el ambiente. En él indica que los estudios que relacionan la capacidad alergénica atmosférica y el conteo de polen deben de tener en cuenta las siguientes tres evidencias o hechos:

1. Que se ha demostrado la existencia de alérgeno polínico en fracciones micrónicas y submicrónicas del aerosol atmosférico.
2. Que también se han encontrado estos alérgenos fuera de la estación polínica, y
3. La existencia de bajas correlaciones entre los niveles de alérgenos y los recuentos de los pólenes.

Davis, en 1967, D'Amato en 1981, y Pacini *et al*, en 1993, sugieren que estas partículas paucimicrónicas provienen de restos de las anteras de la planta como los cuerpos u orbículos de Ubisch de función desconocida, producidos en grandes cantidades, con un tamaño de pocas micras, compuestos de esporopolenina parecida a la de la exina del grano de polen y que pueden contener alérgenos. En 2001, Vinckier *et al*, encontraron estos cuerpos de Ubisch en gramíneas, Betulaceae, Chenopodiaceae, Fagaceae, Polygonaceae, y Urticaceae, pero no en Asteraceae u Oleaceae.

D'Amato en 2001 analiza diferentes estudios que ponen en evidencia la presencia de alérgenos de polen en las fracciones más pequeñas del bioaerosol atmosférico, lo cual podría explicar la patogénesis del asma, aclarar la discordancia entre recuentos polínicos y síntomas alérgicos y explicar la diferente naturaleza y origen de dichos antígenos derivados de la planta en el bioaerosol atmosférico en forma de partículas paucimicrónicas (2-5 μm) como son:

- Antígenos procedentes de fragmentos de hojas y tallos, que pueden ser eluidos y transportados en forma de microgotículas. Busse *et al*, en 1972 y Solomon *et al*, en 1983, identificaron antígeno de polen de *Ambrosía* en estas pequeñas partículas, procedentes de otras partes de la planta.
- Transferencia de los antígenos desde el grano de polen por contacto físico o elución con otras partículas presentes en la atmósfera como son las partículas de emisión diesel (PED) u otras pequeñas partículas

atmosféricas. Diaz-Sánchez *et al*, en 1997, demuestran mediante ensayos en vivo que las partículas DEP inducen asma en pacientes alérgicos al polen de Ambrosía.

- Bajo condiciones climáticas húmedas, de lluvia o tras las tormentas, los granos de polen de las gramíneas tras su ruptura por choque osmótico pueden soltar parte de su contenido a la atmósfera en forma de microgránulos respirables de 0,5-2,5 μm que contienen el alérgeno (Suphioglu *et al*, 1993) (Knox *et al*, 1993). En 1997, Venables *et al*, estudian los casos clínicos de ingresos en urgencias hospitalarias tratados por ataques de asma, tras las tormentas en junio de 1994 en Londres.

La existencia de una actividad alérgica significativa durante los períodos previos y posteriores a la polinización ha sido ampliamente demostrada, para diversos alérgenos, por varios autores, (Spieksma *et al*, 1995) (Pehkonen *et al*, 1994) (Schäppi *et al*, 1997), los cuales afirman que puede haber carga alérgica en partes de planta que no son polen tales como raíces, corteza o pétalos de flor, o que los alérgenos pueden ser resuspendidos de tales partículas después de su deposición en el suelo. También se apunta a la posibilidad de reacciones cruzadas con otros tipos de polen (Pehkonen *et al*, 1994).

El desarrollo de los países ha llevado a un incremento de la vida urbana lo cual lleva consigo una mayor actividad del transporte y, por tanto de vehículos diesel estrechamente relacionados en la emisión de “partículas de escape diesel (PED)”. Las PED consisten en un núcleo de carbón sobre el que se pueden depositar hasta 700 componentes orgánicos diferentes de alto peso molecular. Con respecto a la salud, son las partículas ultrafinas las más claramente implicadas (diámetro $< 0,05 - 0,10 \mu\text{m}$) por su alta reactividad y facilidad para atravesar el epitelio y paredes vasculares (Feo, 2003)

Paralelo al aumento de la contaminación ambiental se ha producido un aumento en la incidencia de las enfermedades alérgicas, tales como rinitis y asma, en las dos últimas décadas. Existe una asociación directa entre PED con tamaño

0,05-1 μm y pólenes: las primeras se unen a los alérgenos principales de los segundos formando aerosoles alérgenos con elevada penetrabilidad en el aparato respiratorio, y alta capacidad para desencadenar episodios de asma en los individuos sensibilizados (Knox *et al*, 1997)

La incorporación de los alérgenos polínicos a las partículas diésel, permite una mayor concentración y permanencia en el aire de los mismos favoreciendo, por tanto, su detección fuera del período principal de polinización y un aumento de las sensibilizaciones (Martínez, 2002).

En el año 2007, De Linares y colaboradores estudian la relación entre las concentraciones de polen y la actividad alérgica del alérgeno Ole e 1 de *Olea europaea* demostrando que existe similitud en cuanto a su dinámica aerobiológica entre las dos variables durante el período principal de polinización, pero también encontraron actividad alérgica Ole e 1 altamente significativa durante los períodos previos y posteriores a la polinización. Por otro lado, no se ha encontrado actividad alérgica de Ole e 1 en corteza, raíces o flores (Villalba *et al*, 1994), lo cual hace presumir la posibilidad de reacciones cruzadas con especies genéticamente próximas tales como *Ligustrum* (Batanero, *et al*, 1994 y 1996) o con aquellas cuyos alérgenos presentan cierta homología como *Plantago* (Pla 1 1), *Lolium* (Lol p 11) y *Chenopodium* (Che a 1) (Lombardero *et al*, 2002), sin descartar la posibilidad de resuspensión.

Todos estos trabajos, además de ofrecer una explicación a los síntomas bronquiales del asma en pacientes con polinosis, cuestionan el tradicional "índice de polen en el aire", el cual puede ser engañoso como indicador de capacidad alérgica atmosférica en determinadas situaciones. Este índice, tradicionalmente calculado mediante el examen de preparaciones microscópicas de muestras recogidas mediante captadores volumétricos, y expresado como número de pólenes por metro cúbico de aire, no refleja la presencia en la atmósfera de micropartículas alérgicas como los gránulos de almidón, los corpúsculos de Ubisch u otras partículas paucimicrónicas alérgicas. Por ello se hace imprescindible poder determinar directamente en las muestras de bioaerosoles

dichas partículas, de manera que sirva para diferenciar los riesgos reales de casos de asma y de polinosis.

Para conocer la verdadera actividad alergénica de la atmósfera es imprescindible utilizar técnicas que cuantifiquen el antígeno. Takahashi *et al*, en 1993 desarrollaron un nuevo método de cuantificación de partículas alergénicas atmosféricas por inmunoblotting.

Así pues, en resumen, para valorar adecuadamente la capacidad alergénica atmosférica es necesario combinar métodos de recuento polínico como “índice de polinosis” y métodos de detección directa de aeroalérgenos como “índice de asma alérgico”. Para ello hemos usado conjuntamente durante todo el período de estudio y de forma ininterrumpida, captadores de pólenes (Burkard spore trap) y captadores de partículas alergénicas (Burkard cyclon) usando métodos de conteo microscópico para identificar y cuantificar los granos de polen, y el método ELISA para identificar y cuantificar alérgenos específicos

La OMS ha identificado el cambio climático como un riesgo ambiental importante para la salud; su potencial impacto sobre el asma y las enfermedades alérgicas ha sido reconocido (McMichael *et al*, 2001). Aunque la etiología del asma es compleja, el reciente aumento mundial del asma podría ser un primer efecto en la salud de los cambios climáticos antropogénicos (Beggs, 2005) (McMichael *et al*, 2001).

En el interior de las grandes ciudades la concentración de granos de polen es menor que en las zonas rurales circundantes por el “efecto barrera” que producen los edificios altos. Sin embargo, la turbulencia creada por el tránsito y/o el viento a través de las calles puede aumentar su concentración. Al igual que la contaminación creada por la combustión de hidrocarburos, principalmente el diesel, potencia el efecto alérgico del polen (Knox *et al*, 1997)

Existen niveles superiores de aeroalérgenos en las áreas urbanas, en comparación con áreas rurales, y están asociados con incrementos globales en la concentración atmosférica del CO₂ y la temperatura pudiendo haber contribuido al

predominio superior del asma de infancia en áreas urbanas. Se han publicado trabajos que asocian incrementos en la producción de polen en las décadas más cálidas así como un incremento en la alergenicidad del polen de árboles que se desarrollan en épocas de temperaturas elevadas. Por otro lado el cambio climático altera la distribución temporal y espacial del polen (Emberlin *et al*, 2002), habiéndose demostrado el incremento del periodo de polinización de algunas especies (Huynen *et al*, 2003).

La pluviosidad durante el otoño y verano condiciona la mayor o menor germinación y crecimiento de las plantas, y por lo tanto la cantidad de pólenes emitidos a la atmósfera (Subiza *et al*, 1998).

Las mayores concentraciones de polen suelen detectarse por las mañanas, ya que las plantas emiten el polen a primeras horas de la mañana (7-10 horas) y al atardecer, pues al enfriarse el aire los pólenes tienden a descender de las capas más altas de la atmósfera hacia la superficie (Pehkonen *et al*, 1994)

En la ciudad de Cartagena los estudios aerobiológicos se inician en el año 1989 con captadores de bajo volumen MCV por parte del Grupo de Investigación “Aerobiología y Toxicología Ambiental” del departamento de Ingeniería Química, entonces perteneciente a la Universidad de Murcia, estudios que se mantienen sin interrupción hasta la actualidad.

Los estudios aerobiológicos que realiza dicho grupo se inician en nuestra ciudad a raíz de los siguientes hechos:

1. Durante los años 1987 y 1988 se producen 3 casos de asma epidémico en Cartagena, en los que el 63% de los pacientes estaban sensibilizados a la soja, que se asocia a las descargas portuarias de grano (Quirce, 1998)
2. En 1989 el ayuntamiento de Cartagena crea la red de captación del aerosol atmosférico en suspensión con captadores de alto volumen en colaboración con el departamento de Ingeniería Química.

En el año 1992 el grupo se une a la puesta en marcha de la Red Española de Aerobiología (REA) y, a través de ella, a la red de Aerobiología Europea (EAN) instalando un captador tipo Hirst para el control de pólenes de la ciudad, marzo de 1993. En el año 2001 se instala un captador Burkard ciclón para la detección de proteínas alergénicas en el bioaerosol de Cartagena. Con los datos obtenidos a lo largo de estos años se constituyen bases de datos de pólenes (1993-2007) y aeroalérgenos (2001-2007) que son utilizados y analizados para la realización de esta tesis.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos.-

1. Conocer el comportamiento aerobiológico del taxón *Olea* en la atmósfera de Cartagena durante el periodo de estudio, definiendo su Periodo Principal de Polinización (PPP).
2. Estudiar qué otros taxones polínicos de importancia alérgica comparten el PPP de *Olea* para valorar la posibilidad de existencia de reacciones cruzadas.
3. Cuantificar en el PPP de *Olea* su contribución, y la del resto de taxones de importancia clínica presentes, a la carga polínica de la atmósfera, para comprender su contribución a la carga alérgica global.
4. Establecer las categorías umbrales para los niveles polínicos de *Olea* en base a los resultados aerobiológicos encontrados y la prevalencia clínica existente en la zona de estudio.
5. Puesta en marcha de la metodología de muestreo y cuantificación de aeroalérgenos polínicos. Para ello se instalará un captador de bajo volumen ciclónico y se recogerán muestras de bioaerosol. A partir del bioaerosol se procederá a la extracción de las proteínas alérgicas y a la cuantificación por técnicas inmunoquímicas de aeroalérgenos de *Olea*.
6. Comparar las concentraciones de aeroalérgeno de *Olea* con los recuentos polínicos tradicionales, valorando las analogías y diferencias existentes entre ambas metodologías.
7. Realizar un juicio crítico de la metodología de cuantificación de aeroalérgenos desarrollada en esta memoria y proponer nuevas líneas de investigación en este campo.

4. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

4. Antecedentes bibliográficos

4.1. Desarrollo histórico de la microbiología del aire

La atmósfera no tiene una población microbiológica autóctona pero es un medio para la dispersión de muchos tipos de microorganismos, tales como esporas, bacterias, virus u hongos y también de otras estructuras como pólenes o partículas de origen animal o vegetal, por ejemplo. La microbiología del aire, como tal ciencia, comienza en el siglo XIX, con Pasteur y Miquel que diseñaron métodos para el estudio de los microorganismos en el aire y descubrieron la causa de algunas enfermedades, tales como las alérgicas (De la Rosa *et al*, 1987)

Ya en la antigüedad, Anaxágoras de Clazomene (500-428 a.C.) tuvo en cuenta al viento como un importante agente en la dispersión de semillas y por tanto en la diseminación de las especies, aunque no imaginó el auténtico papel del polen transportado por el aire (Gousmett, 1988). Del mismo modo se creía que el viento podía traer enfermedades al hombre, a los animales y a las cosechas. De hecho, Hipócrates (460-377 a. C.) pensaba que el hombre se veía afectado por fiebres epidémicas cuando respiraba “contaminantes que son hostiles a la raza humana” (Cabello, 1986)

La existencia de multitud de corpúsculos en el aire fue observada desde la antigüedad. Lucretius (55 a.C.) observó las partículas de polvo brillando en un rayo de sol en una habitación oscura y dedujo que su movimiento se debía al bombardeo de innumerables e invisibles átomos en el aire (Román, 2002), aunque fue necesario esperar a la aparición del primer microscopio para asegurar que existían en el aire microorganismos vivos.

Abū Bakr Muhammad ibn Zakariyā Rāzī (más conocido en el mundo moderno como Rhazes) (865-932), médico persa que escribió en árabe y cultivó la Alquimia tituló uno de sus trabajos: “Una disertación sobre la causa del coriza que ocurre en la primavera, cuando las rosas liberan su perfume”. Es la primera

descripción conocida de la rinitis alérgica estacional debida a las flores (Pioreschi, 1996) (Dodd Memorial Library, 2008)

No es sino hasta el siglo XV cuando se encuentran referencias importantes sobre los aspectos relacionados con el polen, cuando Monardi (1462-1536) (llamado en realidad Nicolás Monardes), médico sevillano, comenzó a estudiar el papel que los estambres desempeñaban en las flores. Es curioso que las primeras observaciones de polinosis estén relacionadas con la floración de los rosales, ya que la sensibilización al polen de rosas es muy poco común. En la mayor parte de casos se trataría de un catarro primaveral cuya aparición coincidía con la floración de los rosales (De la Torre, 1998)

En 1565 Leonardus Botallus (1519-1587), médico anatomista nacido en Asti (Piamonte) y que residió en Padua, describió la existencia del “catarro o mal de las rosas” (cefalea, estornudos, prurito nasal) en su libro “Commentarioli Duo, alter de Medici, alter aegroti munere”, que se publicó en Lyon. En la referida obra relata el caso de un paciente que al oler rosas experimentaba cefalea, prurito nasal y estornudos. Botallus atribuía dichos trastornos al perfume desprendido por las rosas. Experiencias similares a las de Botallus fueron notificadas posteriormente por otros autores, como Johannes Rhodius (1587-1659), Johann Nikolaus Binningerus (1628-1692) (Pelta, 2004).

Las esporas de los hongos fueron vistas por Valerius Cordus, botánico napolitano del siglo XVI, pero fue Micheli (1679-1737) el primero en dibujar las esporas de los mohos aerotransportadas después de su observación (Miquel y Cambert, 1901), mientras que las primeras descripciones de pólenes fueron realizadas por Nehemias Grew (1641-1712), médico y botánico londinense, que estableció que el polen debería alcanzar el estigma para poder asegurar la formación de la semilla (Blanchan, 1917)

En 1674 Antony van Leeuwenhoek, un comerciante de telas, depositó una gota de agua de lago en una especie de microscopio que él mismo construyó. Descubrió lo que él llamó “animáculos” (protozoos, algas y bacterias, entre otros). Sus hallazgos los comunicó a la “Real Sociedad de Londres” en más de 150

escritos, aunque no fueron tenidos demasiado en cuenta. Parece probable que fuese el descubridor de la técnica de microscopía de campo oscuro (Nester *et al*, 1983)

Fue a partir de 1819, con las aportaciones clínicas de dos médicos alérgicos al polen, Bostock y Blackley, cuando el “catarrhus aestivus” llegó a ser más conocido.

El 16 de Marzo de 1819, John Bostock (1774-1846), comunicó a la “Royal Medical and Chirurgical Society of London” la existencia del “Catarrhus aestivus”. Al que consideraba como una afección periódica de los ojos y los bronquios. Logró reunir su propio caso y el de otros 28 pacientes en toda Inglaterra, introduciendo por primera vez en la literatura médica el término “hay fever” y atribuyendo erróneamente la génesis del proceso a la exposición al calor y a la luz del sol. A partir de entonces algunos autores denominaron a la referida afección “Enfermedad de Bostock” (Bostock, 1828).

En 1873 Charles Harrison Blackley comenzó a sospechar que el polen podía ser la causa de sus estornudos y demás alteraciones primaverales cuando al sacudir unas flores en su dormitorio se reprodujeron los síntomas. En primer lugar relacionó el número de granos de polen presentes en el aire y la intensidad de la afección, cubriendo para ello pequeñas láminas de vidrio con una delgada capa de vaselina y exponiéndolas al medio ambiente. La observación microscópica posterior le sirvió para confirmar que cuando sus síntomas empeoraban había mayor contenido de polen en la superficie de sus láminas (Blackley, 1873)

En el siglo XIX comenzó el auténtico interés por la palinología. Se describieron numerosos tipos polínicos, demostrándose su utilidad en taxonomía y así, el número de investigadores que estudiaron los granos de polen y su biología fue *in crescendo*.

Pierre Miquel (1850-1922) fue el investigador que más estudió los microorganismos del aire. Trabajaba en el observatorio de Montsouris en París. Desde 1879 y durante más de 25 años, realizó numerosos estudios creando y

perfeccionando gran variedad de métodos. Desarrolló el primer colector volumétrico capaz de succionar 20 litros de aire por hora, realizando el primer muestreo largo y periódico de la atmósfera con métodos volumétricos, concluyendo que el número de microbios en el aire variaba enormemente en el mismo sitio a diferentes horas, estaciones o altitud (Comtois, 1997)

En el siglo XX, el estudio de los microorganismos del aire sufre grandes altibajos. En los primeros años se continuaron analizando diversos ambientes, siguiendo la línea de los investigadores del siglo XIX, siendo los más novedosos los realizados en el Metro de Londres por Andrews en 1902 y Forbes en 1924, y en Nueva York por Soper en 1908 (Gregory, 1973).

Ya en los años treinta, aparecen los trabajos de Wells, que realizó en numerosos ambientes de Nueva York como las calles, hospitales o escuelas. Tuvo gran importancia el descubrimiento de los “núcleos goticulares”, demostrando que algunos microorganismos patógenos podían transmitirse a grandes distancias y sobrevivir en el ambiente durante semanas o meses (De la Rosa *et al*, 2002)

En 1930 Meier introduce el término Aerobiología y la define como la disciplina que estudia los organismos y partículas biológicas presentes en el aire, tanto de exteriores como de interiores. Aunque en su definición original la Aerobiología se restringió al estudio de organismos vivos transportados por el aire, el hecho de que numerosos contaminantes de origen natural y antrópico afecten a su viabilidad, ha propiciado que en la actualidad esta Ciencia incluya también el estudio de dichos contaminantes. Por lo tanto, la Aerobiología es la Ciencia que estudia las partículas atmosféricas de origen o actividad biológica, su dispersión y su impacto sobre el medio ambiente y los organismos. Es pues, una Ciencia multidisciplinar que incluye ciencias básicas y aplicadas, tales como la patología vegetal, palinología, alergología, bioclimatología, calidad de ambientes interiores, etc. Es en la Medicina, donde ha estado desde un principio fuertemente ligada, debido a que la presencia del polen y las esporas en el aire provoca la aparición de síntomas alérgicos entre la población (De la Rosa *et al*, 2002)

En los años cuarenta se realizaron numerosos estudios capitaneados por Bourdillon y sus colaboradores. Son muy amplios y comprenden desde aires confinados como casas, hospitales (1946) y fábricas (1948), hasta la investigación de la supervivencia de las bacterias (1948) y el descubrimiento de nuevos aparatos y métodos como el muestreador de rendija (1941). También en esta época otros investigadores utilizan nuevos métodos para la detección de microorganismos en el aire, como la precipitación electrostática (Luckiesh *et al*, 1946) y el impacto en cascada (May, 1945).

Hirst propuso en 1952 el método volumétrico para el estudio de pólenes y esporas fúngicas. Este aparato tiene una capacidad de succión de aire de 10 litros por minuto (similar a la capacidad pulmonar del ser humano) y presenta la ventaja de poder realizar curvas circadianas ya que apenas hay dispersión dada la cercanía del portaobjetos a la ventana. En esta época se diseñaron diversos aparatos para facilitar la toma de muestras en el campo, como el transportable de Gregory (1954) o el de Andersen (1958). Todos ellos son muestreadores de impacto, de fácil transporte, mayor volumen de aire analizado y mejor recuperación de los microorganismos. También en estos años empiezan a utilizarse otros métodos que utilizan los filtros de celulosa (Millipore) adaptándolos para el análisis del aire (Goetz, 1953).

En 1979 Edmons define la Aerobiología como el “Estudio de pólenes y microorganismos presentes en el aire, sus fuentes, liberación, dispersión y deposición; su impacto sobre otros sistemas de vida y el efecto de las condiciones ambientales en todos estos procesos”. Los contaminantes antropogénicos y naturales afectan a la viabilidad de los organismos de la atmósfera y del suelo, y por esta razón los gases y partículas contaminantes se incluyen cuando tienen un efecto biológico. Los gases más importantes que afectan adversamente son: SO₂, Óxidos de Nitrógeno, CO y O₃, pero hay muchos más capaces de afectar. El material particulado importante en Aerobiología incluye humos y polvo, radionúclidos, pesticidas, y las formas biológicas tales como virus, bacterias, fragmentos de hongos y esporas, algas, protozoos, polen, etc,.. (Edmonds, 1979)

En Enero de 1990 se crea la Federación Británica de Aerobiología que tiene como fin trabajar y estudiar dentro del campo de la Aerobiología para suministrar coordinación y soporte a todos los grupos y entes individuales interesados en la Aerobiología, así como para difundir entre el gran público el conocimiento que aporta la ciencia (BAF, 2008)

En 1992 se creó la Red Española de Aerobiología (REA). Esta red se encuentra integrada dentro de la European Aeroallergen Network (EAN) / European Pollen Information (EPI) cuyo centro coordinador se encuentra en Viena. Está formada por más de 600 unidades de monitorizaje de polen, situadas por toda Europa, de las cuales una tiene su sede en Cartagena (Departamento de Ingeniería Química y ambiental de la Universidad Politécnica de Cartagena). La mayoría de los centros españoles pertenecen a universidades, colegios farmacéuticos o centros de sanidad ambiental. Se trata de una red académica sin ánimo de lucro, formada por docentes botánicos e investigadores con alta cualificación en temas relacionados con la botánica, la palinología y la dinámica de la atmósfera. La estandarización del sistema de muestreo (muestreadores volumétricos basados en el Hirst Spore-trap) es el paso más importante en el desarrollo de las redes aerobiológicas en el ámbito internacional (Galán, 1998)

Los estatutos de la Federación Británica de Aerobiología definen a esta como “la disciplina científica enfocada en el transporte, a través de la atmósfera, de organismos y materiales biológicamente significativos”, con especial atención a las fuentes de organismos o materiales, liberados a la atmósfera, su dispersión y deposición, y su impacto en animales, plantas o sistemas humanos (BAF, 2008)

El futuro del estudio de la microbiología del aire pasa por el desarrollo de técnicas adecuadas para la determinación de partículas alergénicas aerovagantes coincidentes o no con los picos de recuentos polínicos. Estos estudios son difíciles de realizar, pero es indudable su utilidad junto con los recuentos.

4.2. Aerobiología

El término Aerobiología, acuñado por Meier en los años 30 (Azar, 2006), fue plenamente adoptado para referirse a la disciplina que se ocupa del estudio de los organismos vivos aerotransportados, su diversidad, modos de vida, dependencia y, al mismo tiempo, repercusión en el entorno. En la actualidad comprende un rango muy amplio en el que se incluyen virus, hongos, algas, fragmentos de líquenes, semillas, propágulos de las plantas, protozoos, insectos y partículas abióticas que afectan a la vida de los organismos terrestres, incluyendo el estudio del transporte pasivo de los organismos y partículas de origen biológico en la atmósfera.

Se ha definido la aerobiología como la ecología de la atmósfera (Edmonds, 1973). A pesar de que ya en 1873 Blackley, tal y como se ha indicado anteriormente, realizó estudios en este sentido demostrando la relación directa existente entre concentración polínica en la atmósfera y la alergia (Blackley, 1873), no es sino hasta el siglo XX, en la década de los años 40, que, con la celebración del *Symposium on extramural and intramural aerobiology* esta disciplina empieza con fuerza (Moulton, 1942).

Entre las numerosas áreas científicas que implica la aerobiología, están la Botánica, puesto que los vegetales forman pólenes y esporas que liberan a la atmósfera, y la Medicina, debido a que una proporción notable de estos pólenes y esporas interfiere con la salud de las personas.

4.2.1. La aerobiología y sus relaciones con otras disciplinas.

Tradicionalmente se ha considerado a la Aerobiología como una ciencia multidisciplinaria que comprende la liberación, retención, dispersión, deposición e incidencia atmosférica de esporas, pólenes y otros microorganismos aerovagantes (Ballester-Olmos, 1991).

Actualmente se incluye también dentro de la Aerobiología el estudio de las partículas o los gases abióticos que afectan a los organismos vivos, como por

ejemplo plomo, mercurio, asbestos, cadmio, monóxido de carbono, dióxido sulfúrico (Recio, 1999).

De acuerdo con la fuente de producción y del impacto que ocasionen son estudiadas por distintas ramas de la ciencia, como la botánica, la zoología, la microbiología, la meteorología, la física, la medicina, la bioquímica, la agronomía, entre otras. Pero tradicionalmente y en una forma más restringida, la aerobiología se ocupa de realizar estudios del contenido atmosférico de granos de polen y esporas de hongos, su diversidad y sus concentraciones, que tiene como aplicación principal la repercusión de estas partículas bióticas, sobre la salud humana (Azar, 2006).

Se observó mas recientemente que los granos de polen y las esporas son capaces de transportar, en su superficie, partículas inorgánicas de un lugar a otro. También se demostró que las partículas y los gases contaminantes pueden influir en la forma, ultraestructura y viabilidad de los granos de polen y las esporas y modificar sus proteínas (alérgenos) (Tormo, *et al*, 2006)

Cuando el impacto sobre las personas provoca sensibilización alérgica (en el caso del polen: polinosis) el aerobiólogo colabora con el médico alergólogo, para informarle de cuáles son los tipos y concentraciones de granos de polen de las diversas especies que hay en la atmósfera y estudia la antigenicidad de estas biopartículas aerovagantes. Se ha demostrado que los antígenos polínicos y fúngicos pueden encontrarse en el aire en fracciones submicrónicas, esto le permite penetrar profundamente en el tracto respiratorio y provocar crisis asmáticas, en pacientes alérgicos.

Por tanto, en la actualidad la aerobiología es una ciencia multidisciplinaria que se ocupa del estudio de las partículas biológicas presentes en el aire (p. e. esporas de hongos y granos de polen), así como de las partículas o gases abióticos que afectan a los organismos vivos (plomo, ozono, óxidos de N y S, etc.) (Nilsson, 1992)

4.2.2. Palinología

Podemos definir a la Palinología como la ciencia encargada del estudio de los pólenes y esporas. Tiene especial interés el origen de dichos organismos o materias, su difusión en la atmósfera, dispersión, deposición, e impacto sobre sistemas animales, vegetales o humanos. Se clasifica en:

1. Actuopalinología: Estudia el polen y esporas de plantas actuales (Hulshof *et al*, 1971). Podemos dividirla en:

a) Aeropalinología, definida en 1969 por Erdtman, en su “Manual de Palinología” (Erdtman, 1969), como el estudio de los palinomorfos encontrados en la atmósfera.

b) Melisopalinología, que estudia el polen de las mieles.

c) Bromatopalinología, estudia el contenido de polen en los alimentos.

d) Criminopalinología, estudia el polen en Medicina Legal y Forense.

e) Copropalinología, estudia la presencia de granos de polen en los excrementos. Se encuentra a caballo entre la Actuopalinología y Paleopalinología.

2. Paleopalinología, que estudia el polen fósil en los depósitos y sedimentos.

4.2.3. Estructuras reproductivas

Los datos de este apartado han sido extraídos del Tratado de Botánica Strasburger, 2004

4.2.3.1. Gimnospermas

Nombre que reciben las plantas vasculares que forman semillas pero carecen de flores. Comprenden varios grupos: cicadófitos, ginkgos, coníferas y gnetófitos. Las gimnospermas son plantas leñosas de porte arbustivo, arbóreo o, más raramente, trepador (algunas plantas gnetófitas). Se diferencian del otro filo

de plantas con semillas, el formado por las plantas con flores, en que las semillas no están encerradas en carpelos, sino dispuestas sobre escamas organizadas en conos. Las gimnospermas son las plantas con semillas más antiguas; al parecer, proceden de helechos del devónico. Los cicadófitos conservan los caracteres más primitivos de las actuales plantas con semillas. Las pruebas morfológicas y moleculares sugieren que las gnetófitas comparten un antepasado común con las plantas con flores. Las gimnospermas vivientes están distribuidas por todo el mundo, pero prefieren, en particular las coníferas, las regiones templada y subártica. Cicadófitos y gnetófitos son primordialmente tropicales y subtropicales. Hay unos 70 géneros y 600 especies de gimnospermas vivientes, muchas menos que en muchas familias de plantas con flores.

Características:

Las gimnospermas son plantas leñosas, frecuentemente de grandes dimensiones, provistas por lo general de canales resiníferos. Poseen cambium, lo que les posibilita el crecimiento en grosor. El xilema del tallo posee únicamente traqueidas y parénquima leñoso. No hay fibras ni vasos leñosos. Por lo tanto, las gimnospermas dan maderas blandas. Las hojas, generalmente persistentes o perennes, pueden tener forma de aguja o escamas. Las flores unisexuales presentan una estructura un tanto primitiva, pues constan de escamas que contienen directamente los sacos polínicos en las flores masculinas y los óvulos, en las flores femeninas.

En las gimnospermas, el esporófito prevalece sobre el gametófito; las flores unisexuales tienen forma de estróbilo y las plantas pueden ser monoicas o dioicas. Las esporas producidas por el esporófito son de dos tipos: microsporas, las cuales germinan y producen el gametófito masculino y las macrosporas, de mayor tamaño, que producen el gametófito femenino. Las microsporas se forman sobre hojas especiales del esporófito llamadas microsporófilos y son liberadas cuando de ellas se ha formado ya en parte el gametófito masculino. En efecto, el polen de las gimnospermas está formado por innumerables micrósporas en las cuales ha comenzado a desarrollarse el gametófito masculino. Siempre ocurre la

fecundación en el interior del óvulo, luego se forma el cigoto que da origen a un embrión, que crece y da origen a las semillas.

4.2.3.2. Angiospermas

Son las plantas vasculares con flores que presentan los primordios seminales (óvulos) encerrados por una cubierta protectora denominada carpelo, que al madurar originará, mediante reproducción sexual, un fruto conteniendo las semillas, dichas semillas corresponden a los primordios seminales maduros. Para las plantas, las semillas son la próxima generación, y sirven como el principal medio a través del cual las especies se perpetúan y se propagan. Tras la fertilización, la flor da origen, por transformación de algunas de sus partes, a un fruto que contiene las semillas.

4.2.3.3. Partes de la flor

Filogenéticamente, la flor es una rama modificada. La flor considerada típica es la de las angiospermas, y está constituida por cuatro verticilos (pisos) de hojas modificadas (antófilos).

Los sépalos son los que envuelven a las otras hojas en las primeras fases de desarrollo, cuando la flor es sólo un capullo. También evitan, en las especies entomófilas, que los insectos accedan al néctar sin pasar por los estambres y estigmas. Los sépalos se sueldan en muchos casos para formar una estructura acopada que justifica el nombre de cáliz (copa) con que se designa al conjunto de los sépalos.

Los pétalos son, en los casos típicos, hojas de colores llamativos que atraen visualmente a los agentes polinizadores. El conjunto de los pétalos constituye la corola.

Los estambres son hojas muy modificadas portadoras de órganos masculinos, los sacos polínicos (microsporangios), que residen en las anteras, cada una de las cuales se apoyan en un filamento. Los estambres pueden ser muy numerosos, aunque lo más frecuente es que sean una o dos veces el número de

pétalos. En la base de los estambres pueden aparecer glándulas productoras de néctar (nectarios), que en otros casos son parte de los pétalos. El conjunto de los estambres se llama androceo.

Por último las hojas más superiores y más pegadas al eje son los carpelos. Estas son portadoras de órganos femeninos, llamados primordios seminales u óvulos, de los que derivarán, tras la fertilización, las semillas. Los carpelos pueden formar uno o más órganos llamados ovarios. El fruto se forma principalmente por la transformación del ovario u ovarios, pero a veces están implicadas otras partes, sobre todo cuando el ovario se desarrolla hundido dentro del tallo de la flor, en la parte llamada tálamo, donde se insertan las diversas piezas florales (ovario ínfero). El conjunto de los carpelos se llama gineceo.

En un amplio contingente de angiospermas, las monocotiledóneas, es característico que sépalos y pétalos sean iguales, llamándose en este caso tépalos y al conjunto perigonio.

En muchos casos las flores están complementadas en su base por brácteas, hojas modificadas, que contribuyen a las funciones de las partes florales, por ejemplo la protectora o la atractiva.

4.2.4. El grano de polen

Definición

El grano de polen es el gametófito masculino en gimnospermas y angiospermas, esto es, la estructura que produce los gametos masculinos y los transfiere a la parte femenina. Los granos son derivados del proceso meiótico de las células madre del polen y en su madurez es una célula bi- o tri-nucleada rodeada por una pared que tiene la importante función de proteger al microgametófito en su camino entre la flor masculina y la femenina. La pared del grano de polen es muy resistente a la pérdida de agua y a las inclemencias ambientales para impedir cualquier daño durante su aerotransporte (Frenguelli, 2003)

Características organolépticas

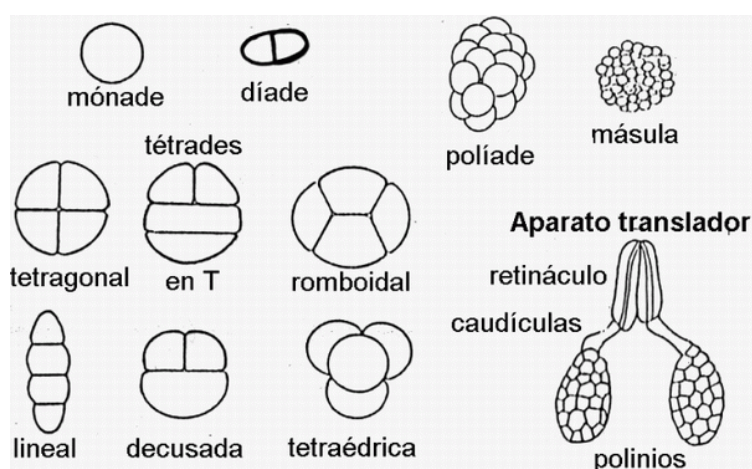
Se presenta como un polvo cuyo color varía en relación con la especie de que procede, siendo generalmente amarillo o café claro, aunque también se puede encontrar blanco, rosado, anaranjado, verde, rojizo, violáceo e incluso negro. Es más difícil de observar sobre las flores que el néctar. Al igual que el color de los pólenes, el sabor y olor de los mismos son también variables según su procedencia. El sabor varía desde el dulce al amargo. El olor resulta característico de cada flor, independiente del de sus pétalos o del polen de otro tipo de flores (Valdés *et al*, 1987).

Unidades polínicas

Son las distintas formas en que se libera el polen. Los granos solitarios se llaman mónadas; si están unidos por parejas: díadas; si son grupos de cuatro: tétradas; (Ericaceae; algunas especies de *Ludwigia*); más de 4, hasta 32: políadas (Leguminosas, Anonáceas); si el número de elementos no es discernible, másulas (Orchidaceae); por último los polinios son una masa de polen de uno o más lóculos de la antera constituyendo una unidad (Asclepiadaceae, Orchidaceae). A veces los polinios están acompañados por estructuras producidas por el androceo o el gineceo, que constituyen el aparato traductor.

Figura 4. 1 Unidades polínicas

<http://www.hiperbotanica.net/tema22/tema22-9polen.htm> (29-02-2008)



4.2.4.1. Biología celular del polen

Todo lo relativo a este apartado ha sido extraído del trabajo que Maruxa Suárez Cervera y Juan A. Seoane Camba titulado “Biología celular del polen: origen y función de los alérgenos polínicos” realizaron para Laboratorios Menarini en el año 2005 (Suárez-Cervera *et al*, 2005).

Formación del grano de polen y evolución de las células del tapete

El proceso ontogénico del grano de polen o gametogénesis masculina, comienza en el saco polínico de la antera con la división de unas células esporofíticas diploides que reciben el nombre de células madre. La pared del saco polínico está formada por cuatro capas: epidermis, endotecio, capa intermedia y tapete. La capa mas interna es el tapete que constituye un tejido directamente implicado en la formación de los granos de polen

Durante el desarrollo de los granos de polen se establece un patrón de organización de la pared polínica, esporodermis, básicamente relacionado con la posición de las aperturas y estratificación y ornamentación de las dos capas principales: la exina, o capa más externa, formada a su vez por dos subcapas, ectexina y endexina y la intina o capa mas interna. La diversidad y complejidad de la pared polínica está directamente relacionada con las numerosas funciones que esta tiene que llevar a cabo: proporciona protección física al contenido citoplasmático, determina las rutas de transferencia de agua y participa en el transporte de proteínas y enzimas involucradas en la interacción entre el polen y la superficie estigmática. Por otra parte, presenta una estructura muy elaborada, con un diseño específico, determinado genéticamente, que aporta caracteres taxonómicos de gran utilidad en el reconocimiento de los distintos tipos de polen.

Al inicio del proceso, las células madre se rodean de una envuelta especial de calosa (1-3 glucano) que les proporciona un aislamiento parcial ya que permite el paso selectivo de moléculas provenientes del tapete. Cada una de las células madres experimenta una división meiótica; como resultado de la cual se forma una tétrada haploide, que se mantiene unida durante un tiempo por la

envuelta de calosa. Seguidamente, y gracias a la acción de una calasa producida por las células del tapete, la pared de calosa se disuelve y las microsporas quedan libres en el lóculo del saco polínico. Al mismo tiempo, durante esta secuencia se va depositando la pared del grano de polen, mediante la influencia directa de las células del tapete. Las microsporas experimentan una transformación continuada en su contenido citoplasmático, sufriendo una mitosis que da lugar a dos células: una responsable de la fecundación (célula generativa) y otra de la nutrición (célula vegetativa).

Secuencialmente, en la superficie de la microspora se va depositando la esporodermis. Comienza con la incorporación de primexina (glycocálix) entre la pared de calosa y la membrana plasmática. La deposición es centrípeta. Los precursores de la exina se sintetizan en las células del tapete y en la microspora simultáneamente de manera que ambos contribuyen a su formación. Después de que la capa externa, exina, se haya consolidado y la microspora haya sufrido la mitosis, se deposita la intina. En este momento se considera que la microspora se ha convertido en grano de polen joven.

Podemos encontrar dos tipos de tapete: secretor y ameboide. Las células del secretor se mantienen en su lugar hasta el final de su degradación, pero las del ameboide forman un plasmodio en contacto con las microsporas en desarrollo. Su papel en el desarrollo de las microsporas incluye la producción y liberación de proteínas, la formación de precursores de la pared (esporopolenina), y el depósito de sustancias lipídicas que al final del desarrollo recubren exteriormente la pared de los granos de polen, como la trifina y el pollenkitt, este último formado por ceras, lípidos y proteínas. Al pollenkitt se le atribuyen funciones como participar en la dispersión de los granos de polen, intercambio de agua entre el polen y el exterior, protección frente al sol y a la pérdida de agua, color, atracción de polinizadores; además favorece la dispersión de proteínas de la antera que se transportan en el exterior del polen, induciendo respuesta alérgica a proteínas no específicamente gaméticas.

Los tapetes secretores producen además los orbículos tapetales (Orbículos o cuerpos de Ubisch) cuyo componente mayoritario es la esporopolenina. Son pauci-partículas, y su presencia en la atmósfera libres o asociados a pólenes les caracteriza como posibles alérgenos (Suárez-Cervera, *et al*, 2005)

4.2.4.2. Localización celular de los alérgenos polínicos

Los alérgenos polínicos son proteínas, glucoproteínas o lipoproteínas de bajo peso molecular, intracelulares, que se difunden a través de la pared del polen cuando está en contacto con un medio húmedo o acuoso (Knox *et al*, 1993) (Casas *et al*, 1996).

Se han localizado también alérgenos en zonas extracelulares, como cavidades de la exina, intina y orbículos o corpúsculos de Ubisch de familias tales como Betulaceae, Chenopodiaceae, Fagaceae, Poaceae, Polygonaceae y Urticaceae. Sin embargo no se han encontrado en Asteraceae ni Oleaceae (Miki-Hirosige *et al*, 1994) (Suárez-Cervera *et al*, 2003) En especies de Chenopodiaceae, Poaceae y Urticaceae los orbículos están asociados a la exina del polen, lo cual indica la posibilidad de la aportación de estos a la atmósfera durante la antesis (Vinckier *et al*, 2001).

4.2.4.3. Morfología de la pared celular y clasificación de los pólenes

Todo lo relacionado con la morfología se ha obtenido de los trabajos de Giuseppe Frenguelli “Pollen structure and morphology” (2003) y de Jordina Belmonte Soler *et al*, en “Polinosis”, Laboratorios Menarini (2002)

4.2.4.3.1. Estructura de la pared celular

En la pared del grano de polen se pueden distinguir dos capas: la más externa es denominada “exina” y está compuesta de esporopolenina, químicamente muy resistente y degradable sólo por oxidación, compuesta a base de terpenos, los cuales parece ser que se originan por polimerización oxidativa de carotenoides o esteres de los mismos. La capa más interna, llamada “intina” está

compuesta de celulosa, proteínas y sustancias enzimáticas, y es muy similar, en cuanto a estructura y composición, a la pared de cualquier célula vegetal. Al microscopio óptico podemos ver la exina, y es esta la que da las características morfológicas necesarias para la identificación polínica.

La exina se divide, a su vez, en una capa externa, la sexina (de Sculptured Exine), que no se halla en contacto con la intina, y la nexina (de Nonsculptured Exine) que cubre a la intina. Según la morfología y estructura de la sexina podremos clasificarla como Tectada, semitectada, intectada, compacta, granular, o alveolar.

4.2.4.3.2. Escultura de la pared celular

Las diferentes esculturas de los granos de polen son consecuencia de la arquitectura de la sexina. En la estructura típica del polen de angiospermas, la sexina se compone de pequeñas columnas dirigidas radialmente hacia el exterior desde la nexina, llamadas “columelas” soportando un techo o “tectum” que puede estar perforado o adornado con diferentes esculturas de un modo característico.

El tectum puede ser completo (polen tectado), parcialmente cubierto (semitectado) o completamente ausente (intectado). En el polen intectado, las columnas se denominan “báculos” o “columelas” si son cilíndricas. Si las columnas no son cilíndricas estas reciben nombres como clavado o gemado dependiendo de la forma de las columnas. A veces los elementos esculturales tienen forma de pequeñas verrugas (verrucoso), pequeñas escamas (escábrido) u otros elementos granulosos (granulado).

En algunos tipos tectados y semitectados las cabezas de las columelas se conectan en dos direcciones para formar un modelo reticular; las paredes del retículo se llaman “muro”, los espacios entre ellas “lúmina” y al polen que lo presenta “reticulado”. Si el muro forma estructuras paralelas formando estrías el polen se denomina “estriado”. Una situación intermedia da lugar al polen “rugulado”.

A veces, el tectum tiene perforaciones de varias formas o tamaños, y esculturas superiores que son descritas en base a su forma de la misma manera que los tipos infratectales (clavado, baculado, etc...) (Frenguelli, 2003) (Elvira-Rendueles, 2001).

4.2.4.3.3. Clasificación según polaridad

La tétrada juega un papel importante, pues ella es responsable de la disposición del grano de polen, de su polaridad y, por ende, de su forma, así como también de la situación de las aperturas.

En cuanto a la polaridad, cada grano de polen presenta un área proximal que corresponde a la zona más cercana al centro de la tétrada y una zona distal que corresponde al lado externo opuesto. El centro de cada una de las zonas se denomina polo, habiendo por tanto un polo proximal y otro distal. La línea imaginaria que une ambos polos se denomina eje polar.

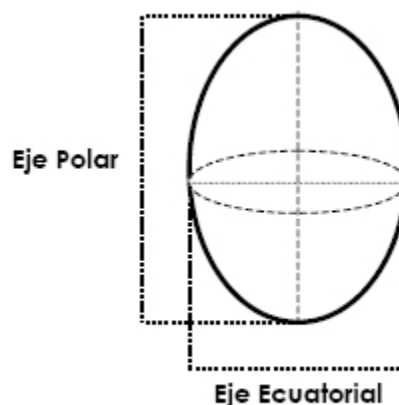
Además existe otra línea perpendicular al eje polar por el ecuador, llamada eje ecatorial o diámetro ecuatorial.

Tabla 4. 1 Nomenclatura polen según su polaridad
(Valdés, 1987)

Clasificación por polaridad	Características
Apolar	No se reconocen zonas polares
Polar	Zonas polares definidas
Isopolar	Zonas polares semejantes
Subisopolar	Zonas polares ligeramente distintas
heteropolar	Zonas polares diferentes

Figura 4. 2 Esquema de los ejes de un grano de polen

(Valdés, 1987)



Según Valdés en 1987, los granos de polen pueden ser simétricos o asimétricos y según la polaridad de los mismos se pueden distinguir los cinco modelos siguientes:

Tabla 4. 2 Clasificación polínica según simetría y polaridad (Valdés, 1987)

Características	
Isopolar radioisométrico	Un plano horizontal y dos o más verticales con simetría de igual dimensión
Heteropolar radioisométrico	Sin plano horizontal de simetría
Isopolar bilateral	Tres planos de simetría: uno horizontal y dos verticales
Heteropolar bilateral	Dos planos distintos de simetría verticales
Polar asimétrico	Polares o apolares sin plano de simetría

4.2.4.3.4. Clasificación en base a su forma

Se podría considerar a los granos de polen como pequeñas esferas, pero la realidad es que pronto se deforman debido a la discontinuidad física de la pared que los recubre (sistema apertural) y a la acción del medio (natural o artificial)

que los rodea, por lo general causante de turgencias y plasmólisis que el mecanismo harmomegático de los granos (las aperturas permiten cambios de volumen para la acomodación del polen a distintos grados de humedad, fenómeno conocido como harmomegattia) no puede neutralizar.

Debido a que la forma del grano de polen está sometida a cambios, y siendo un carácter importante en los estudios polínicos, los palinólogos acordaron referir la misma a granos acetolizados en evitación de desuniformidades en las descripciones palinológicas, y considerar al menos dos formas observadas al microscopio óptico: una en vista polar (corte ópticoecuatorial), cuando el haz luminoso es paralelo al eje polar; y otra, en vista ecuatorial (corte óptico meridiano), cuando este es perpendicular.

La forma del polen se define utilizando la razón de los ejes polar y ecuatorial (P/E), dando lugar a la siguiente clasificación: (Valdés, 1987)

Tabla 4. 3 Clasificación del polen según la razón P/E.
(Valdés, 1987)

RAZÓN P/E	DENOMINACIÓN
> 2.00	Perprolado
1.33 – 2.00	Prolado
1.14 – 1.33	Subprolado
1.00 – 1.14	Prolado-esferoidal
1.00	Esferoidal
0.88 – 1.00	Oblado-esferoidal
0.75 – 0.88	Suboblado
0.50 – 0.75	Oblado
< 0.50	Peroblado

4.2.4.3.5. Clasificación en base a su tamaño

Según la longitud del eje más largo, se pueden distinguir seis grupos de pólenes, que se indican en la siguiente tabla. En cuanto al número de granos de polen que originan las anteras se puede decir que es muy variable y, por lo general, muy elevado.

Tabla 4. 4 Tipos de pólenes según longitud del eje mayor
(No siempre el eje polar coincide con el eje mayor) (Valdés, 1987)

MEDIDA DEL EJE MAYOR	DENONINACIÓN DEL POLEN
< 10 μm	Muy pequeño
10 – 25 μm	Pequeño
25 – 50 μm	Mediano
50 – 100 μm	Grande
100 – 200 μm	Muy grande
> 200 μm	Gigante

Las dimensiones de los granos de polen de especies anemófilas suelen oscilar entre las 15 y las 40 micras, aunque aparecen también pólenes mucho más grandes, de la familia de las Pináceas, debido a la presencia de flotadores que facilitan su dispersión y permanencia en el aire.

4.2.4.3.6. Clasificación en base a tipo y número de aperturas.

El tipo y número de aperturas es uno de los caracteres prioritarios en la descripción de los granos de polen.

La exina está generalmente provista de áreas adelgazadas o interrumpidas, por lo común especialmente delimitadas, llamadas aperturas, las cuales son variables en número y posición, así como en morfología, que pueden

permitir la salida del tubo polínico y la regulación del volumen hídrico para la acomodación del polen a distintos grados de humedad (harmomegatia).

Algunos pólenes carecen de aperturas, denominando a estos como inaperturados. Pero, por lo general, los pólenes presentan de una a muchas aperturas, que básicamente son de dos tipos: largas o colpos y cortas o poros. Los colpos son aperturas alargadas y paralelas al eje polar, y en la mayoría de los casos recubiertos por una fina capa de exina. Esta fina capa es la llamada membrana del colpo. Suele ser elástica, lisa o con analogía con el resto del grano, aunque en este último caso tendrá menos relieve y sólo se conservarán fragmentos.

El número de colpos varía de 1 a 30, incluso más. La presencia de un solo colpo es característico de las angiospermas monocotiledóneas. El número y disposición de los colpos, cuando hay más de uno, depende de la posición y modo de formación de los granos de polen en la tétrada, pues los colpos se forman sobre la superficie de contacto de un grano de polen con los otros granos hijos, en un estado inicial de su desarrollo. El colpo de los granos monocolpados se encuentra situado en la cara distal. En las angiospermas dicotiledóneas lo frecuente es encontrarnos con granos tricolpados. En los granos tricolpados, la longitud de los colpos, así como sus bordes y formas, son variables. En cuanto a lo primero, no llegan a los polos. El conjunto de los tres colpos sólo es visible en visión polar. En visión ecuatorial sólo uno o dos colpos serán visibles y el resto podrán ser observados por transparencia a través del grano de polen. En los tetracolpados, los colpos están en el ecuador a distancias iguales, pero en la mayor parte de los casos no siguen los meridianos, sino que pasan oblicuamente por el ecuador y se unen dos a dos en cuatro puntos formando ángulos de 120° .

Si las aperturas alargadas se disponen no paralelas al eje polar del grano de polen, sino que perpendiculares al mismo, se denominan sulcos, y si se encuentran en cualquier otra posición, rugas. A veces, las aperturas se disponen en espiral (polen espiraperturado). Se denomina mesocolpia al área delimitada por

dos colpos adyacentes y al resto de la superficie como apocolpia. El grano de polen sincolpado, es aquel que presenta los colpos unidos en uno o ambos polos.

En cuanto a los poros, que son orificios de la exina, son muy variables en número pudiendo oscilar desde uno en Poaceae a más de cien en Chenopodiaceae. El número y forma, en general, se mantiene constante para un determinado grupo.

La posición de los poros está estrictamente determinada para una especie dada. En los granos monoporados, el poro se encuentra en posición distal. Si los granos de polen tienen tres o más poros, se disponen generalmente equidistantes en el ecuador. Cuando los granos de polen no sólo tienen colpos, sino también poros (pólenes colporados), estos se disponen normalmente en el centro.

El área delimitada por dos poros adyacentes se denomina mesoporia, y al resto de la superficie apoporia. En el plano, el poro se presenta generalmente como una abertura redondeada o más o menos oval; esta abertura tiene un contorno doble por los diferentes niveles de la exina. La sección mayor se ve por transparencia y corresponde al contorno exterior; el contorno interior es la sección más pequeña. En un corte óptico se ve la disposición de las capas de la exina alrededor del poro. Puede ocurrir que las capas de la exina no se desdoblen, es decir, que no exista separación entre las partes interna y externa de la exina; son los poros sin cámara o vestíbulo. Por el contrario, en otros casos se produce la separación entre dichas partes de la exina, originando una cavidad por debajo de la ectoapertura; en este caso se habla de poros con cámara o vestíbulo.

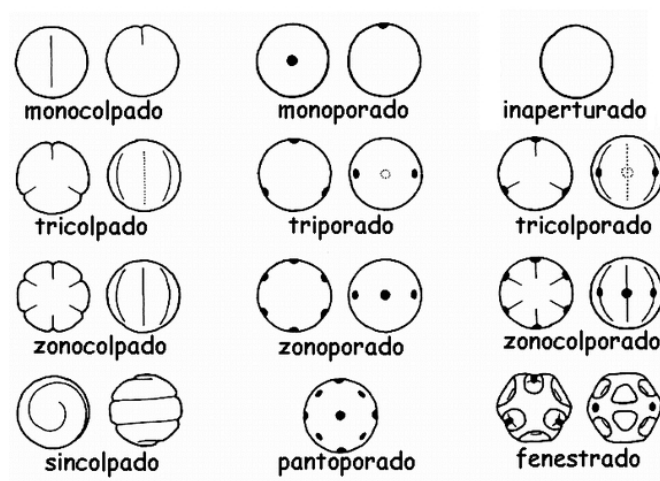
Las aperturas varían en su disposición pudiendo disponerse:

1. En los polos (aperturas polares)
2. En el ecuador
3. En toda la superficie

Los colpos o poros pueden afectar a la ectexina (ectoaperturas) o bien a la endexina (endoaperturas). Si afectan a una sola capa, se habla de aperturas simples; de aperturas compuestas, cuando afectan a ambas capas (ectexina y

endexina), siendo, en este caso, las aperturas diferentes en forma y tamaño. A veces, afectando a ambas capas, no se presentan tales diferencias, por lo que en este caso se consideran como aperturas simples (Valdés, 1987).

Figura 4. 3: Aperturas granos de polen.
(Faegri e Iversen, 1989)



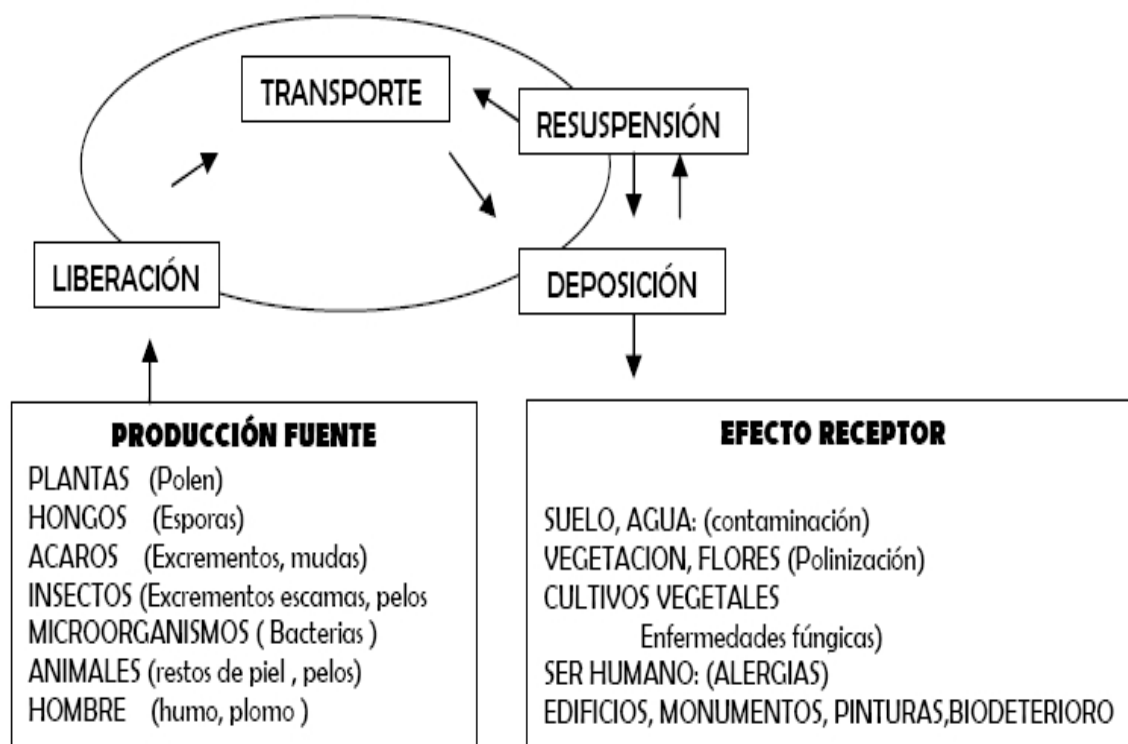
4.2.4.4. Producción, descarga, transporte, dispersión y resuspensión del polen.

De la antera al receptor

El objetivo fundamental de la producción de polen es la de encontrar un óvulo, en general de la misma especie, y poder realizar la fecundación para así garantizar la perpetuidad de las especies, aunque esto no se consigue si no es con una gran cantidad de polen, para el caso de la polinización anemófila, o con la participación de insectos (entre otros) para una polinización entomófila.

La Aerobiología se considera como una ciencia multidisciplinaria que comprende la liberación, retención, dispersión, deposición e incidencia atmosférica de esporas, pólenes y otros microorganismos aerovagantes (Pathirane, 1975). El proceso que sufre el polen desde la dehiscencia de la antera hasta su receptor se puede esquematizar como sigue:

Figura 4. 4 Transporte del grano de polen
(Azar, 2006.)



Produccion de polen

La producción de polen es un evento que ocurre con una relativa precisión en el ciclo de las plantas. El momento de la liberación de polen y la cantidad del mismo producida son resultados de adaptaciones genéticamente controladas o de distintos modelos de comportamiento de las plantas anemófilas (Edmonds, 1979)

La producción estacional de polen varía ampliamente según una gran cantidad de variables que en general son imposibles de medir debido a su complejidad, aunque se han aceptado como medida de producción de polen los valores de su deposición (Solomon *et al*, 1972).

Fechas y producción de polen

El problema que supone para la fecundación la distancia entre plantas es mitigado en parte por una relativa precisión en la emisión y producción de polen. El número de granos de polen producidos en un determinado lugar geográfico se incrementa simultáneamente en todas las plantas, dando lugar así al incremento instantáneo de las concentraciones de polen en el aire.

La estacionalidad de la polinización anemófila se puede subdividir en tres grupos distintos:

1. Árboles y arbustos de bosques templados que emiten polen en la primavera y al comienzo del período de crecimiento.
2. Plantas herbáceas anuales y perennes que emiten polen al final del verano y principio del otoño, cerca del final del período de crecimiento.
3. El resto de plantas herbáceas que emiten polen durante el período de crecimiento (Edmonds, 1979)¹

Las plantas anemófilas generalmente dominan en áreas de alta densidad vegetal y escasa biodiversidad, siendo especies minoritarias en zonas menos densas y con una gran biodiversidad (Edmons, 1979). En las regiones templadas las especies arbóreas anemófilas dominantes pertenecen a las familias de las Fagaceae, Betulaceae y Juglandaceae. En la zona Mediterránea Española destacan Oleaceae, Cupresaceae, Arecaceae, *Platanus* y *Populus*.

Algunas plantas adaptadas a un alto estrés hídrico, son también anemófilas, como las Poaceae, Chenopodiaceae-Amarantaceae y Asteraceae. En zonas de suelos salinos se desarrollan especies anemófilas como Cyperaceae, Thyphaceae, Poaceae y Asteraceae. En zonas desérticas, herbáceas tipo Poaceae y Chenopodiaceae se concentran en zonas de arroyos.

¹ La estacionalidad de la polinización indicada por Edmons se corresponde con el centro europeo no en el sur mediterráneo como es nuestro caso

La producción de polen en árboles y arbustos anemófilos es muy variable. Algunos pinos son capaces de producir polen muy pronto, con un mínimo de 7 años, pero la mayoría de árboles, especialmente angiospermos, no dan flores o frutos en sus primeros 45-50 años, continuando su floración posterior cada año hasta su muerte.

Después de la producción de hojas y flores en la primavera, los árboles inician la floración y foliación para el siguiente año. Esto ocurre entre Mayo y Julio. Al final del verano, la cantidad de polen disponible para la siguiente floración ya está determinada porque las células que se han de convertir en granos de polen ya están presentes (Matthews, 1963)

El desarrollo de polen cesa cuando llegan los primeros fríos que inducen al letargo del árbol. El desarrollo del polen se reinstaura después de que las temperaturas de primavera exceden de modo regular un umbral inferior de temperatura, usualmente cerca del punto de congelación. Cuando se alcanza la madurez, el polen ya formado se libera, ocurre la fertilización y comienza la producción de semillas.

A partir de entonces, la producción primaria del árbol se canaliza hacia el crecimiento, almacenamiento, y producción de semillas. En los árboles caducos de floración temprana las hojas no aparecen hasta después de la floración. En los árboles caducos de floración tardía las hojas aparecen durante o antes de la floración. Las hojas y los primordios florales para la siguiente primavera se inician de nuevo varios días o semanas después de que la formación de semillas ha comenzado en ambos tipos de árboles y arbustos (Edmonds, 1979)

El polen producido en plantas de final de verano, anemófilas, herbáceas, es el responsable de la fiebre del heno en regiones templadas. Casi todas son plantas colonizadoras que invaden los sustratos recientemente alterados².

² *En Cartagena la planta herbácea responsable de fiebre del heno al final del verano e inicio del otoño es Chenopodiaceae-Amaranthaceae.*

El ciclo de vida de plantas herbáceas anemófilas consta de un período de crecimiento inicial vegetativo seguido de un período reproductivo que precede a la senescencia y muerte (plantas anuales) o al letargo invernal (plantas bianuales o perennes). El período de crecimiento comienza en primavera después de que el frío ha desaparecido. Las semillas de las plantas anuales germinan y las raíces de las perennes generan nuevos brotes.

Cuando la energía solar decrece los recursos nutritivos de raíces y hojas inferiores son transferidos hacia los nuevos brotes. El desarrollo de primordios florales comienza cuando los períodos de oscuridad nocturna alcanzan una longitud crítica, lo cual es diferente para cada especie.

Después de que las semillas se han formado, las plantas anuales mueren, mientras que la mayoría de las perennes continúan fotosintetizando y almacenando nutrientes hasta que llegan los primeros fríos otoñales y matan las partes aéreas.

La producción de polen en otras plantas herbáceas anemófilas parece ocurrir continuamente porque poseen una extensa amplitud de medios en los que el polen y la polinización pueden realizarse. Ejemplos de estas plantas son las gramíneas y las Chenopodiáceas.

Descarga de polen

La descarga de los granos de polen desde las anteras de las flores es un evento que ocurre pasivamente y es dependiente de todo un conjunto de factores entre los que encontramos la lluvia, la presión atmosférica, la humedad relativa, el viento, y un largo etcétera de variables.

El proceso es como sigue: primero se abre la flor o se extienden las anteras. El tejido de la antera se seca y se rompe. El polen cae de la antera y se deposita por gravedad en las partes florales o en las hojas por debajo de las anteras. Por último, el viento lleva el polen lejos de la planta. Todo esto ocurre

normalmente por la mañana cuando las condiciones ambientales son propicias. (Edmonds, 1979)

La proporción del polen emitido que se convierte en aerotransportado es función de la velocidad del viento, de la turbulencia atmosférica, de la lluvia, de la altura de la antera con respecto a las superficies circundantes, y de la densidad de la vegetación próxima. Aproximadamente las tres cuartas partes del polen emitido se convierte en aerotransportado en días de viento. Mucha menos cantidad tiene la probabilidad de convertirse cuando las plantas crecen muy densamente (Edmonds, 1979)

Las anteras se pueden abrir antes o después de la flor según la secuencia de receptividad macho-hembra en determinadas especies. El polen puede dejar las anteras tan pronto estas se abran o puede quedar retenido en la antera por estructuras derivadas de las células del tapete tales como la trifina, el polenkitt o filamentos de esporopolenina, por ejemplo, a la espera del agente polinizador (viento en el caso de anemófilas) (Pacini *et al*, 1997).

Se ha indicado que la viabilidad de los granos de polen en la atmósfera es casi inexistente, apenas entre 2 y 4 horas salvo algunas excepciones, aunque esto no influye en la alergenidad (Subiza, 2000).

Transporte, dispersión, permanencia deposición y resuspensión

Los fenómenos relacionados con la permanencia, transporte y dispersión en el aire, están fuertemente ligados a los procesos atmosféricos. Esta parte de la aerobiología está determinada por el estudio de los factores físicos, como: las turbulencias del aire, la insolación, la lluvia, etc. Pero también hay que tener en cuenta los aspectos aerodinámicos de las partículas como: forma, volumen, tamaño, peso, elasticidad, etc.

Son aspectos adversos los obstáculos, que al oponerse a los vientos, disminuyen su velocidad y su potencia de arrastre, y las precipitaciones, que arrastran las partículas suspendidas (De la Rosa *et al*, 2002)

La sedimentación de las partículas por gravedad solamente es importante en el aire en calma. Generalmente, hay demasiadas turbulencias para que esto suceda, excepto en zonas de vegetación densa, donde la velocidad del viento disminuye, o en condiciones estables durante la noche, cuando la capa laminar limitante alcanza varios metros de altura.

El lavado del aire por la lluvia termina rápidamente con el proceso de dispersión, siendo diez veces más eficiente que la sedimentación y la impactación. Su eficacia está en función del radio de las gotas de lluvia y de las velocidades terminales de la gota y de la partícula. El tamaño óptimo de las gotas de lluvia es el mismo para todos los tamaños de partículas, y se ha calculado menor de 2 mm (Starr *et al*, 1966) pero la eficacia de la deposición decrece con el tamaño de la partícula. La lluvia disminuye exponencialmente la concentración de partículas del aire con respecto al tiempo, tardando más las de mayor tamaño. En 1967, Gregory y colaboradores demostraron que el 72% de las partículas de 4 μm permanecía en el aire después de 120 minutos

En 1988 Miller y Wang demostraron que las variaciones en humedad relativa, temperatura, presión atmosférica y carga electrostática pueden alterar la eficacia en el lavado atmosférico. El incremento de la eficacia ocurre para una disminución de la humedad relativa y/o incremento de la temperatura, presión y carga electrostática.

En último lugar, después de la deposición de las partículas en los sustratos, existe la posibilidad de reflatación o resuspensión en el aire, repitiéndose los fenómenos de transporte y deposición o de enterramiento y posible descomposición.

4.2.4.5. Estación polínica

Existen diferentes condiciones y criterios para definir y limitar la estación polínica. La curva anual de polen de un taxón determinado se representa como concentraciones medias diarias. En Aerobiología a menudo sólo se utilizan los datos del polen correspondientes al periodo anual donde se registra la mayoría del polen total acumulado. Dependiendo de ciertas condiciones o criterios en la literatura se define a este periodo como:

- *Estación de polinización* (Nilsson *et al*, 1981).
- *Periodo de polinización o periodo principal de polinización PPP* (Comtois, 1998) (Frenguelli *et al*, 2002).
- *Estación efectiva de polen* (Giorato *et al*, 2000) y
- *Estación atmosférica de polen* (Jato *et al*, 2002).

Los índices de polen diario acumulados se pueden representar con una curva sigmoideal en la que se tiene en cuenta el período delimitado entre los dos puntos de inflexión, desde el primer punto, correspondiente al principio del periodo hasta el segundo punto, el cual es considerado como el final del período de polinización (Pathirane, 1975).

4.2.4.5.1. Inicio del periodo de polinización

Para desarrollar modelos de predicción del comienzo de la polinización se pueden seguir varios criterios, entre los que se encuentran los siguientes:

- Tomar como fecha de comienzo el día en el que los recuentos medios diarios acumulados (a partir de una fecha específica dependiendo del taxón, normalmente el 1 de Enero) alcanzan un valor dado: T50, T75, T100, T125 para las gramíneas y T25 para *Betula*.
- Otros autores utilizan la fecha de inicio desde el primer día en el que las concentraciones medias diarias alcanzan alguno de los dos siguientes parámetros: un valor determinado (Davies *et al*, 1973) (Norris, 1998) (Driessen *et al*, 1989, 1990) (Rogers, 1997) (Newnham, 199) (Clot,

2001), o un porcentaje dado del total anual (Pathirane, 1975) (Frenguelli *et al*, 1991) y, por último:

- La fecha de comienzo de la estación polínica se puede tomar a partir del día en el cual los granos de polen aparecen en la atmósfera de forma continua; en este caso se utilizan numerosos criterios diferentes para determinar tal fecha (Clot 1998) (García-Mozo *et al*, 1999) (Jato *et al*, 2002)

Las curvas del polen aerotransportado de plantas localizadas en las proximidades del captador representan el período de floración de estas plantas. Sin embargo, el comportamiento de dichas curvas está influenciado por otros muchos factores. La fecha de comienzo puede, de hecho, corresponder a polen de plantas de floración temprana de cualquier otra parte, que ha sido transportado largas distancias.; algunos autores excluyen este polen para evitar confusiones, cálculos erróneos sobre la estación y curvas sustancialmente modificadas (Dahl *et al*, 1996) (Porsbjerg *et al*, 2003). Además, fenómenos tales como turbulencias pueden mantener al polen en el aire dispersado por el viento o resuspendido pasada la floración. Esto puede alterar la sincronización entre las fechas de floración y curvas de polen aumentando los recuentos cuando la floración ha finalizado.

Algunos tipos polínicos incluyen especies con diferentes periodos de floración a lo largo del año, en muchos casos se pueden definir 2-3 periodos claros de polinización intra-anual. Dependiendo de las condiciones atmosféricas locales, ciertas especies florecen 2 veces al año como es el caso de Chenopodiaceae-Amaranthaceae en el sureste de España (Cartagena), que florece en primavera y otoño (Elvira-Rendueles, 2001).

En base a lo anteriormente expuesto, sería sumamente útil determinar si, de manera fiable, puede usarse como único criterio para delimitar el periodo principal de polinización aquel en el que el polen está presente en el aire, o si es necesario un conjunto de criterios tales como tipo de polen y área geográfica, entre otros. Se hace necesaria en aerobiología la estandarización de términos que posibiliten definiciones precisas y fácilmente comprendidas en cualquier área.

4.2.4.5.2. Período de polinización

En 2006, Victoria Jato y colaboradores publican un trabajo de revisión muy interesante, relacionado con los diferentes métodos para el cálculo del periodo de polinización usados por diferentes autores de prestigio, del que se presenta un resumen de los aspectos más relevantes:

▪ **Persson y Nilsson (1981):** El período del tiempo cuyo límite va desde concentraciones de polen diariamente acumulado del 5% de la suma total hasta el tiempo cuando las concentraciones de polen acumulado son del 95%; o sea el periodo de tiempo que concentra el 90% de la cantidad de polen.

▪ **Andersen y Torben (1991):** El período en el cual la suma de concentraciones de polen diario alcanza desde el 2,5% de la suma total hasta el 97,5%, o sea, el tiempo con el 95% de la cantidad total de polen.

▪ **Galan et al (1995):** El período en el cual la suma de concentraciones de polen diario alcanza desde el 1% de la suma total hasta el 99% o sea el tiempo con 98% de la cantidad total de polen.

▪ **Mullenders et al (1972):** Define el inicio del período principal a partir del día, de un período de 5 días, en que la concentración alcanza al menos el 1% del total anual durante tres días consecutivos y el final cuando la concentración es menor de 0,9% durante más de 10 días seguidos, suponiendo un 85% del recuento anual total, comenzando en el 10% y finalizando en el 95%.

▪ **Spieksma et al (1995):** Usa el mismo criterio que Mullenders et al, (1972) pero sugiere que el 1% del total anual debería estar definido como el total anual medio de los años considerados.

▪ **Jäger et al (1996):** la estación polínica comienza el primer día que se alcanza una concentración mayor del 1% del polen anual, sin que se produzcan más de 6 días con valor 0 cero. Finaliza cuando 95% del polen anual total es alcanzado.

▪ **Lejoly-Gabriel y Leuschner (1983):** Comienza el día en que la suma de los porcentajes anuales de polen está por encima del 5% del taxon,

siempre que en este mismo día se produzca una liberación mayor del 1%. Acaba el último día en el que el porcentaje es mayor del 1% y la suma de los porcentajes de este día y los dos días precedentes son superiores o iguales al 3%.

▪ **Giorato M. et al, (2000):** Periodo en el cual el índice de polen en el aire diario excede 30 granos/m³ para gramíneas y Urticaceae y 20 granos/m³ para otra familia.

▪ **Sanchez- Mesa et al (2003):** El principio y el fin de la estación de polen de las gramíneas están definidos como aquellos días en los que los índices de polen en el aire son mayores o iguales que 30 granos/m³

▪ **Feher y Jarai-Komlodi (1997):** El periodo comprende los primeros y últimos días cuando hay una concentración de 3 granos/m³ por encima de la media de los 5 días de la semana pasada o posterior.

La curva anual de polen de un determinado taxón refleja las concentraciones medias diarias de todo un año. Los estudios aerobiológicos utilizan a menudo solamente datos del período durante el cual se registra la mayoría del polen total anual. Hay varios términos en la literatura para definir este período:

- Estación polínica, estación polínica principal o período principal de polinización (Nilsson *et al*, 1981).
- Período de máxima producción de polen (Gonzalez *et al*, 1998).
- Período de polinización, estación de polinización, estación principal de polinización (Lejoly-Gabriel *et al*, 1983) (Jäeger *et al*, 1996)
- Estación efectiva de polen (Giorato *et al*, 2000) y
- Estación de polen atmosférico (Jato *et al*, 2002)

El período de floración para algunos tipos de polen (Cupressaceae y, en algunos sitios, *Alnus*) se extiende del fin de un año hasta los primeros meses del siguiente, un hecho ser tenido en cuenta al calcular los totales anuales.

El uso de diferentes métodos para delimitar el período origina las mayores diferencias en los resultados. Un método común para el cálculo de la estación polínica, es usar un porcentaje dado del total anual para calcular el comienzo y el fin de la estación principal de polen. La longitud de las colas al comienzo y final del período principal de polinización dificultan el análisis estadístico y originan variaciones considerables cuando un porcentaje del total anual se use para limitar la estación de polen; si los índices de polen en el aire totales anuales se diferencian significativamente entre años, de la misma forma los porcentajes serán muy diferentes. Por tanto, la aplicación de otros métodos puede resultar ser más útil.

La duración de la estación de polen y el polen total anual pueden variar año a año influenciados por el clima. Los años cálidos se adelanta la floración al favorecer la liberación de polen de anteras y pueden conducir a una estación más corta de polen; En contraste, la liberación de polen es más lenta en climas lluviosos o en días sin sol, alargándose por tanto, la estación polínica.

Los valores del final de la estación polínica, finalizada la floración pueden, en ciertas especies, estar sobre-representados con valores a veces altos por el alto nivel de polen en el suelo que se resuspende, lo que de ser tenidos en cuenta supondrían un alargamiento falso de la estación polínica, esto se ve favorecido con bajas velocidades de viento.

Las mayores diferencias de duración de estación y fechas de inicio y final aplicando los diferentes criterios se observan para las gramíneas. Dicho polen incluye a un gran número de especies silvestres o cultivadas, que florecen dependiendo de la especie desde el principio de la primavera hasta el final del verano, por lo que dependiendo del número de especies diferentes que existan en un área local determinada, variará el número de estas que aportan polen al aire (en valor o índice polínico y espacio temporal o periodo polínico).

Se ha demostrado la habilidad del polen de *Olea* para recorrer distancias largas e intermedias, lo que explicaría la presencia de niveles relativamente elevados en zonas donde la presencia del olivo no es significativa o en lugares

donde no hay fuentes locales de *Olea* (Gastaminza *et al*, 2005).

También en zonas de índices muy alto de polen de olivo como la ciudad de Córdoba el polen no sólo procede de los árboles que rodean la ciudad si no de zonas alejadas de altitudes superiores que florecen más tardíamente y se transportan hasta la ciudad.

Para seleccionar un adecuado criterio sobre la definición y cálculo de la estación polínica se deben de tener en cuenta los factores locales que afectan a la presencia del polen en el aire, tales como número de especies existente en la ciudad o zona, posibilidades de transporte de cada tipo polinico, condiciones meteorológicas locales, variabilidad del índice de polen interanual. (Jato *et al*, 2006).

4.2.4.6. Polinización y sus tipos

El término polinización hace referencia al desplazamiento o trasiego del polen desde una flor que lo produce, a otra flor de su misma especie, en principio, que lo recibe. Este fenómeno tan sencillo a primera vista, trae asociado unas consecuencias inmediatas y de gran trascendencia, como son la formación del fruto, de una importancia vital en la agricultura y la formación de la semilla, que le servirá al vegetal para perpetuar su especie y multiplicarse.

La polinización se desarrolla en tres fases:

1. Liberación del polen de la parte masculina de la flor
2. Transferencia del órgano masculino al femenino
3. Germinación y posterior fertilización

Polinización anemófila

En algunas plantas con flor el polen se libera al aire y, por lo general, queda atrapado en el viento. Parte de este polen cae en los estigmas de plantas de la misma especie, de tal modo que se lleva a cabo la polinización cruzada. Este tipo de polinización no es muy eficiente, ya que gran parte del polen cae en sitios

que no son los estigmas adecuados. Es por esta razón que las plantas que se polinizan por el viento invierten gran cantidad de energía para asegurar que habrá buenas posibilidades de éxito. Este tipo de polinización va a ser la responsable de los fenómenos de alergia al polen

Las plantas con polinización anemófila, por lo general, tienen flores pequeñas con sépalos y pétalos muy reducidos e incluso ausentes; los granos de polen son pequeños y ligeros (no forman cúmulos); los estambres están expuestos al viento de tal modo que el polen pueda volar fácilmente; los estigmas son plumosos y están expuestos al viento, de manera que el polen tenga más posibilidades de llegar a ellos y adherirse; y con frecuencia las flores son unisexuales y se encuentran agrupadas en inflorescencias que cuelgan de la planta para facilitar la liberación y captación de los granos de polen.

Polinización zoófila

Los animales visitan a las plantas con sus propios propósitos y sin darse cuenta, transfieren el polen. Las plantas atraen a los animales, ya que les ofrecen dos fuentes de alimento: en primer término, buscan el polen mismo, por lo cual la planta debe sacrificar parte de su producción para que otra fracción de polen llegue a estigmas receptivos; en segundo lugar, la planta produce néctar muy atractivo para los polinizadores; al tomar el néctar, sin querer, se llevan parte del polen adherido que depositarán en la próxima flor a la que visiten.

Las plantas con polinización zoófila, por lo general, tienen flores con colores atractivos, y formas, aromas y figuras atractivas para los polinizadores; presentan guías que llevan al animal hacia la porción que contiene el alimento, de modo que permita la polinización y la transferencia del polen al animal; fácil acceso de algunos animales específicos al alimento; polen más grande y pegajoso que el transportado por el viento.

Polinización hidrófila

Este tipo de polinización es menos frecuente. Esta puede tener lugar en la superficie del agua (Epihidrofilia) o en el interior del agua (hipohidrofilia). La polinización epihidrófila es única en cuanto que se produce solamente en dos dimensiones, lo cual conlleva a un ahorro importante en la producción de polen.

La polinización es esencial para la reproducción sexual de la gran mayoría de las plantas con flor y un proceso clave para entender la evolución de la gran diversidad vegetal que existe hoy en día sobre el planeta. Las interacciones mutualistas que ocurren entre plantas y animales polinizadores son también críticas en el mantenimiento de la biodiversidad y de la integridad de los ecosistemas, tanto naturales como de origen antrópico. La ocurrencia de este proceso está influenciada por un gran número de factores: las características de la flor (determinadas principalmente por su historia evolutiva), de la planta, de la población, de la comunidad y del ambiente, así como características de los agentes bióticos y abióticos con los cuales las plantas interactúan para ser polinizadas.

4.2.5. Métodos de captura

4.2.5.1. Tipos de captadores

Los primeros métodos de muestreo de aire ya fueron recogidos por Miquel y Cambert en 1901 y los desarrollados en el siglo XX fueron revisados por du Buy *et al*, en 1945, posteriormente por Gregory en 1961 y por Lynch y Poole en 1979.

Las técnicas utilizadas son diversas, de las cuales, la sedimentación, filtración, el impacto sobre distintas superficies sólidas y el borboteo en medios líquidos, son las más importantes y utilizadas (Buttner *et al*, 1997).

4.2.5.1.1. Muestreadores de precipitación.-

Precipitación gravimétrica.-

En un principio, los captadores utilizados estaban basados en el principio de gravedad y consistían en superficies preparadas con sustancias adhesivas o retenedoras, expuestas horizontalmente. A comienzos del siglo XX se utilizaban placas de Petri (Hesselman, 1919), céspedes compactos de musgos (Beer, 2007) (Firbas, 1931) y portaobjetos (Wodehouse, 1935). Algo más tarde nacen los captadores de Durham (Durham, 1946) y Tauber (Tauber, 1974).

Estos captadores por precipitación gravimétrica tienen la ventaja de que se puede saber la clase y diversidad de partículas captadas, pero únicamente son cuantificables por unidad de superficie, sin tener en cuenta el volumen de aire que se analiza.

Buscando una mayor coherencia y comprensibilidad en los muestreos aerobiológicos se idearon los captadores que cuantifican pólenes por volumen de aire. Las partículas son aerotransportadas en trayectorias que pueden considerarse virtualmente horizontales, pudiendo de esta forma aprovechar la inercia de las mismas para el impacto en captadores que presentan superficies untadas con sustancias adhesivas en donde dichas partículas quedarán retenidas

Precipitación electrostática.-

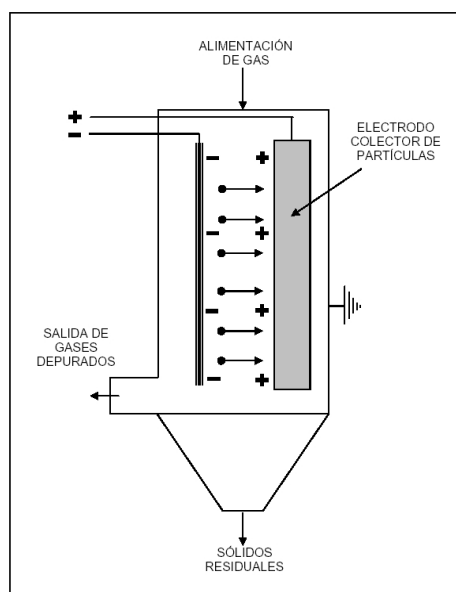
Se basa en la acción de un campo eléctrico sobre las partículas sólidas cargadas eléctricamente. Las partículas son cargadas mediante una corriente de electrones que circula entre dos electrodos, gracias al alto voltaje existente entre ellos (del orden de 60 kvolts DC). Las partículas se cargan negativamente y son atraídas hacia electrodos colectores, donde se depositan y separan del resto de la corriente gaseosa. El gas fluye en dirección paralela a los electrodos. Son altamente eficaces para captar partículas de tamaño pequeño, incluso menores de 1 μm y presentan mínimas pérdidas de carga.

Tabla 4. 5 Efecto del tamaño del material particulado sobre la eficiencia de los precipitadores electrostáticos
(Zaror, 2000)

Tamaño de partícula	Eficiencia de remoción
$< 5 \mu\text{m}$	70 – 80%
5 – 20 μm	95 – 99%
20 – 40 μm	100%
$> 40 \mu\text{m}$	100%

Figura 4. 5 Esquema de precipitador electrostático

(Zaror, 2000)



Precipitación térmica

Los precipitadores térmicos son muy similares en cuanto a funcionamiento a los anteriores, precipitadores electrostáticos, aunque no se ven implicadas cargas eléctricas. Cuando el gas fluye a través del muestreador, las partículas son dirigidas desde un medio caliente a otro frío en el que se acumulan. Cualquier partícula suspendida en el aire que pase a través del campo térmico es forzada a dirigirse a la superficie fría (Kethley *et al*, 1952)

4.2.5.1.2. Muestreadores por impacto

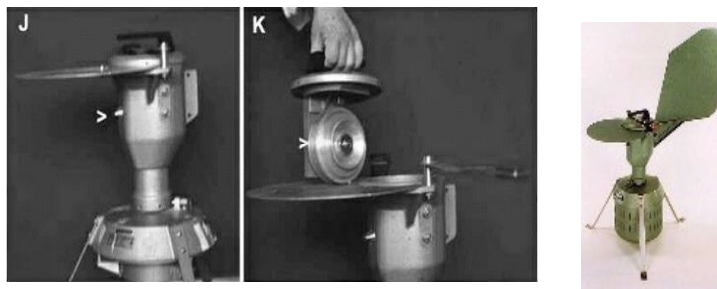
Impactadores por succión

En este caso, se tiene una bomba de vacío que impulsa el aire aspirado contra la superficie receptora. El más ampliamente utilizado es el ideado por Hirst (Stach, 2003)

Captador tipo Hirst

El captador tipo Hirst es un recolector de succión en el cual las partículas impactan en un tambor rotatorio. Al tambor se le acopla una cinta transparente (por ejemplo, Melinex) a la que se ha añadido una delgada capa de grasa de silicona. El aire es conducido hacia el interior por una rendija de 14 x 2 mm a una proporción ajustable entre 10 y 35 L/min, aunque el standard establecido es de 10 L/min, y las partículas impactan en la superficie de la cinta del tambor. El aire impacta siempre de forma perpendicular al tambor gracias a la colocación de una aleta que hace las veces de veleta y que dirige la entrada de aire de forma que este incida perpendicularmente al tambor. El tambor gira a una velocidad establecida de 2 mm/hora y es una norma habitual hacerlo girar durante siete días. Después de la exposición el tambor se saca y la cinta se corta en segmentos de 1/7 que representan cada uno a un día de la semana. Estos segmentos se tiñen con una solución colorante y se llevan al microscopio óptico

Figura 4. 6 Foto Burkard 7 days
www.burkard.co.uk



Burkard Spore trap.- J: montado. K: durante el montaje

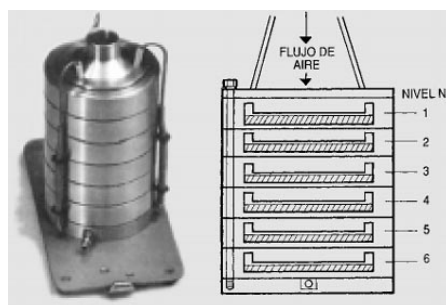
Impactador en Cascada

El impactador en cascada es un muestreador-fraccionador de partículas con funcionamiento a bajo o alto volumen de flujo aéreo. Cada fracción contiene 400 de orificios con un tamaño preciso y apropiado para el tamaño de las partículas que se pretenden recoger. El tamaño de los orificios decrece conforme pasamos de un fraccionador al siguiente. Las partículas aerotransportadas penetran en el instrumento y son dirigidas hacia las superficies de recogida por la corriente gaseosa que atraviesa los orificios. Cualquier partícula no recogida por un fraccionador sigue la corriente de aire hasta el fraccionador siguiente en donde puede quedar atrapada o, de nuevo, pasar al siguiente. Este flujo está controlado externamente, aunque un flujo aéreo estándar es 28,5 L/min (NATIBO, 2001)

Las fracciones suelen ser, por ejemplo, las siguientes: 7 μm , 4,7 μm , 3,4 μm , 2,1 μm , 1,1 μm y 0,65 μm . Al ser los orificios cada vez más pequeños la velocidad del flujo aéreo va aumentando paulatinamente.

Las capturas en las tres primeras fracciones se suelen hacer en filtros. En La última fracción se recogen partículas submicrónicas.

Figura 4. 7 Fotografía y esquema del impactador en cascada (Hernández, 2003)



A diferencia de los métodos de sedimentación, los impactadores en cascada presentan una alta eficacia en la captura de partículas pequeñas, siendo ideales para el aislamiento y cultivo de hongos aerovagantes, estudio de contaminación fúngica de interiores y, sobre todo, el estudio de los aeroalérgenos (Lacey *et al*, 1996(a) y (b)).

Se ha demostrado repetidamente (Riediker *et al*, 2000), que bajo ciertas condiciones, la eficacia de recolección no es satisfactoria. Un problema muy frecuente es el rebote y contaminación por partículas entre las distintas fracciones, sobre todo en la última (llamada también back-up). Para prevenir los rebotes y contaminación por polen del back-up se utiliza un engrasado del primer o segundo filtro. De este modo no se observan pólenes en el back-up.

Los factores más relevantes de los rebotes y remociones de partículas son la velocidad del aire y el tamaño de partícula. A velocidades de 3-4 m/s se reduce en un 30-60% la recolección de pólenes (comprobado para pólenes de *Ambrosia*), sin embargo es buena para partículas submicrónicas en filtros de fibra de vidrio, incluso a velocidades altas. Pero a velocidades altas se produce una gran cantidad de rebotes y remociones, sobre todo si no se utilizan filtros engrasados.

Por todo ello es aconsejable utilizar un alto volumen de muestreo con filtros engrasados en la primera o segunda fracción (Riediker *et al*, 2000)

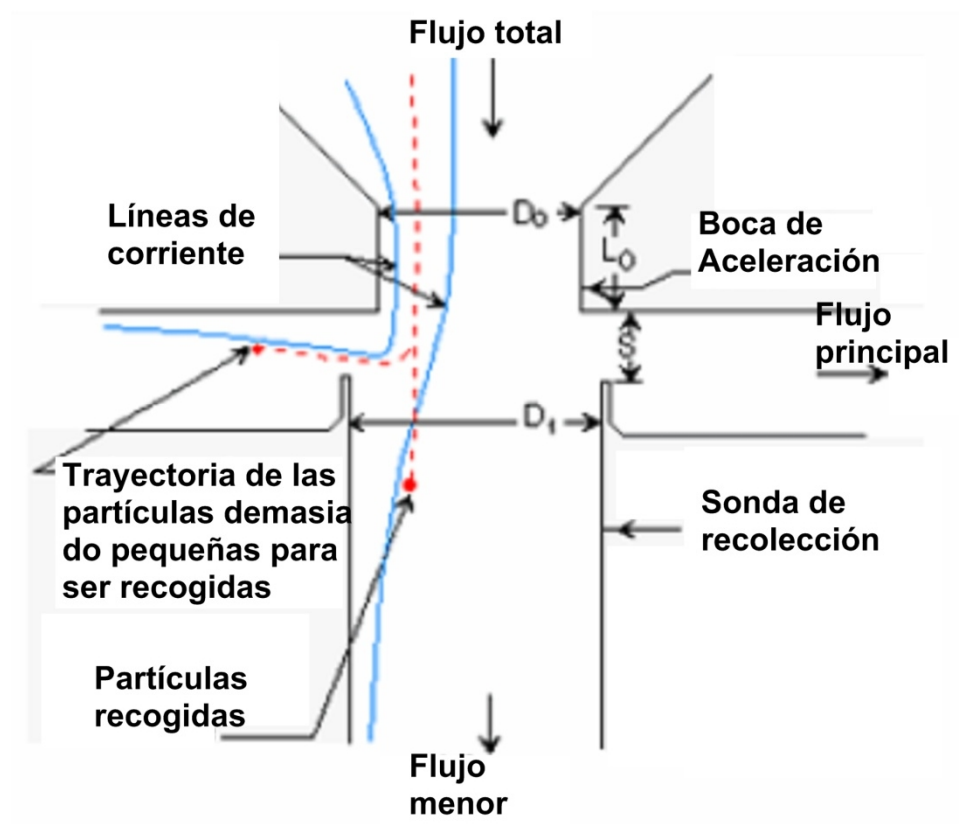
Rotorod

Desarrollado en 1957 por Metronic, sigue siendo muy utilizado, sobre todo en EE.UU. Consiste en dos varillas recubiertas con un medio de impactación que rotan como si de un ventilador se tratase, pero de forma intermitente. Se suelen utilizar dos varillas de 1,6 mm de ancho por 50 mm de largo, revestidas con grasa de silicona para recoger las partículas impactantes. El Rotorod (Perkins, 1957) se hace funcionar a 2.400 rpm y dado que el brazo tiene 9,6 cm de largo, el volumen calculado de trabajo es de 45 L/min cuando opera continuamente. Después de esto, las varillas pueden ser llevadas al microscopio óptico y, una vez teñidas, realizar un recuento microscópico

Impactador Virtual

Colecta partículas de dos tamaños: menores que 10 μm y mayores de 2,5 μm (denominadas gruesas) y menores de 2,5 μm (denominadas finas). La concentración es la suma de las fracciones gruesas y finas. El sistema dicotómico de toma de muestra más común tiene un caudal de entrada de 16,7 L/min. Las partículas con diámetro mayor de 10 μm son separadas inercialmente. En la siguiente figura se muestra un esquema. El aire conteniendo el material particulado es forzado a través de un acelerador de tipo boquilla o pitón pasando luego a un impactador virtual donde se expande, dividiéndose el flujo de aire. La partículas finas hacen un giro brusco hacia afuera para seguir la velocidad elevada del flujo inicial, pasando a través del filtro de partículas finas. A causa de su mayor inercia, las partículas gruesas continúan su recorrido por el tubo receptor del impactador virtual y son colectados en el filtro de partículas gruesas. Una pequeña porción de partículas finas son también colectadas en el filtro de partículas gruesas por lo que hay que realizar una corrección en el cálculo. El resultado es la separación de partículas en dos tamaños. Esta operación se puede repetir las veces necesarias y crear así un fraccionamiento de las partículas por tamaños

Figura 4. 8 Impactador virtual.



4.2.5.1.3. Muestreadores centrífugos

Muestreador ciclónico

Ciclón es un nombre genérico dado a varios instrumentos diferentes que tienen en común la propiedad de utilizar la fuerza centrífuga para separar partículas de una corriente líquida o gaseosa. Representa la opción más eficaz y económica en la elección de separadores inerciales. Son los instrumentos más utilizados en la separación de material particulado en la industria.

Los ciclones tienen una simplicidad inherente a su diseño y normalmente carecen de partes móviles, con capacidad de recolección de partículas pequeñas. Los diseños actuales de ciclones pueden separar partículas de tan sólo $2 \mu\text{m}$ con una eficacia del 90%. La fuerza centrífuga aplicada a las partículas en un ciclón es

mucho mayor que la de la gravedad o la inercial aplicada en un separador por gravedad o inercial respectivamente. La fuerza centrífuga aplicada es normalmente del orden de varios cientos de veces la aceleración gravitacional. De este modo, los ciclones representan uno de los más eficaces métodos para la separación de partículas con diámetros de más de 2 micras.

En todos los ciclones las partículas son separadas de la corriente gaseosa por la fuerza centrífuga. Las partículas son dirigidas hacia el exterior de una columna de gas que circula en hélice, mientras que el gas, relativamente libre de partículas, sale del centro del vórtex. Los dos factores principales que influyen en el funcionamiento del ciclón son:

1. Velocidad a la cual una partícula dada se mueve por la pared del ciclón y
2. Tiempo que la partícula permanece en movimiento allí en donde será recogida antes de que el gas abandone el aparato.

La eficacia total de recolección del ciclón puede ser calculada y elegida teniendo en cuenta los siguientes parámetros (Heumann, 1997):

1. Velocidad de entrada
2. Diámetro del cuerpo del ciclón
3. Viscosidad del gas
4. Densidad de las partículas
5. Geometría del ciclón
6. Razón Longitud/Diámetro del ciclón
7. Diámetro del orificio de salida
8. Longitud del conducto de salida
9. Diseño de la entrada del gas
10. Forma del conducto de salida
11. Cono del ciclón



4.2.5.1.4. Muestreadores por filtración

Otro grupo de captadores lo forman aquellos que funcionan por filtración, ya sea a través de membranas de materiales diversos o de fibras; tal es el caso del captador Cour (Cour, 1974). Los captadores por filtros de membranas son usados mayoritariamente en la captura de partículas no biológicas, excepto una modificación de ellos, el CAP (Captador de Aeroplankton), diseñado especialmente para pólenes y esporas (Suárez-Cervera *et al*, 1983).

Captador Cour

Un captador Cour es un muestreador por filtración que consiste en un eje perpendicular al suelo, que sostiene, encajado en su extremo superior, un eje perpendicular capaz de girar 360°. En un extremo de este eje hay dos marcos protegidos, cada uno, por una visera y, en el otro, una veleta que lo orienta según el viento dominante. Levantando las viseras de los marcos se puede encajar la superficie que interceptará las partículas aerotransportadas, un filtro preparado con cinco pliegues de gasa hidrófila untados con una mezcla de aceite de silicona y rodeado por un marco de plástico. Este filtro es cuadrado y mide 20 cm de lado. En el captador se exponen dos filtros: uno se cambia una vez por semana, y el otro se usa como contrapeso y como resumen mensual

Borboteadores

Este es un cilindro con líquido recolector en su interior (en la mayoría de los casos) que recoge partículas por inmersión. El capilar que proviene de la toma de aire penetra en el líquido del cilindro e impacta en el suelo de este a gran velocidad. Las partículas son frenadas de repente y de este modo capturadas en el líquido. Un volumen típico es de 50 mL para una capacidad máxima de 125 mL. La muestra recogida puede entonces ser tratada por varios métodos: recuento microscópico, cultivo para organismos viables, citometría de flujo y otras técnicas.

Este aparato requiere un flujo gaseoso de 12,5 L/min controlado por una bomba de succión.

Los medios de recolección pueden ser variados: agua destilada, medios de cultivo, medios densos, revestimiento de las paredes del vaso recolector con grasa, etc...

Presenta una eficacia de recolección del 100% para partículas mayores de 1 micra. Para partículas submicrónicas decrece hasta el 90%.

Las muestras recogidas son aptas para ser analizadas mediante las siguientes técnicas:

- Cultivo para microorganismos viables
- Microscopía
- Ensayos bioquímicos (endotoxinas)
- Inmunoensayos para cuantificación de aeroalérgenos
- Test de PCR
- Etc...

Borboteador en cascada

Estos impactadores son similares a los de medio sólido o de filtros. La diferencia estriba en que en estos últimos se pueden poner distintos medios de recolección tal como medios de cultivo y proceder a la recolección de microorganismos viables.

Es un muestreador de bajo volumen: 20 L/min.



Figura 4. 9 Borboteador en cascada.
(<http://www.burkard.co.uk/impact.htm>)

4.2.5.1.5. Muestreadores biológicos

Un sistema no demasiado utilizado en el muestreo del aire para la cuantificación de polen es el sistema biológico de detección.

La detección de agentes biológicos de un modo eficiente requiere un sistema de análisis multicomponente debido a la complejidad del medio.

En líneas generales, un sistema de detección biológica consta de las siguientes partes:

- **Colector.** Es el instrumento encargado de recoger todas las partículas de la corriente gaseosa.
- **Detector inicial (Trigger/cue).** Es el primer nivel de detección. Si detecta partículas biológicas pone en marcha los siguientes mecanismos
- **Detector.** Es el encargado de distinguir si la partícula es biológica o inorgánica en origen.
- **Identificador.** Identifica el tipo de agente biológico recogido por el sistema. Se limitan a un conjunto de agentes preseleccionados y no se pueden identificar agentes fuera de estos.

El identificador puede ser muy distinto según el método elegido (NATIBO, 2001).

4.2.6. Identificación del polen

4.2.6.1. Polen completo

Microscopia de campo claro

Manual-visual

Este método ya ha sido descrito en el apartado correspondiente al captador de Hirst. Requiere personal entrenado y especializado en la identificación polínica. Se identifica gracias a la comparación con los atlas

polínicos existentes. Está perfectamente estandarizado y se cuantifica como granos de polen (P) por unidad de volumen (m^3)

Recuento de partículas

En Aerobiología es importante aplicar una metodología estándar que nos permita comparar los datos en diferentes zonas de estudio. La normalización del procedimiento también permite que se realicen análisis a escala global, con independencia de las fronteras administrativas o regionales.

Desde la constitución de la Red Europea de Aeroalérgenos (EAN) en 1988, todos los integrantes de dicha red han adoptado una metodología común, que incluye, entre sus puntos más importantes:

- La utilización de muestreadores volumétricos tipo Hirst (entre los que está incluido el Burkard) .
- Expresión de los resultados como una media diaria de granos de polen/ m^3 de aire y día.

Todos los tipos de muestreadores utilizados en las Redes de Monitorizaje de Polen de la EAN están basados en el diseño inicial de Hirst (Hirst, 1952). Inicialmente se diseñó para realizar muestreos de esporas de hongos en el aire en función del tiempo.

Actualmente hay dos modelos comerciales disponibles en el Mercado: Muestreador Volumétrico de 7-días Burkard (de Burkard Manufacturing Co. Ltd.; Uk) y Muestreador Fijo Lanzoni VPPS 1000 (de Lanzoni s.r.l.; Italia). Otros modelos portátiles para muestreos en determinadas zonas también se encuentran disponibles.

Existen varios métodos para realizar los recuentos polínicos en las preparaciones obtenidas con muestreadores tipo Hirst. Todos ellos tienen en común el análisis de un porcentaje de la superficie de la preparación a microscopía óptica. La elección de un método por parte de un grupo determinado

se ha debido a razones históricas, tradicionales y convencionales. El más utilizado es el de los transectos horizontales (con lecturas de barridos continuos)

Los resultados se expresan en media diaria de granos de polen/m³ de aire, con independencia del método de lectura utilizado. Este resultado se obtiene considerando los siguientes factores:

1. El volumen de aire muestreado: 10 L/min o 600 L/hora = 14.4 m³ y día
2. La superficie analizada: un 10-13% de la superficie total
3. La amplificación del microscopio a la hora de hacer las lecturas (40x)
4. El diámetro del campo examinado al microscopio con un objetivo determinado.

Un recuento diario se obtiene de la lectura hecha con el objetivo x 40 de cuatro barridos longitudinales de 48 mm realizados en el porta (lo que representa aproximadamente el 12% del área impactada en un día). El número de pólenes contados en esos cuatro barridos se multiplica por un factor de conversión, lo cual nos da el número medio de granos por m³ de aire. Esto significa que puede haber momentos del día en que las concentraciones fueron mucho más altas que las dadas como media diaria (Subiza, 2001)

Finalmente, los datos pueden ser comparados internacionalmente solo cuando los resultados se expresan en términos de media diaria de granos de polen por metro cúbico de aire.

Microscopía de contraste de fases

Este tipo de microscopía se usa cuando la partícula aerotransportada es casi invisible y no es posible montar un medio alternativo.

El sistema óptico del microscopio de contraste de fases difiere del microscopio ordinario (de luz) solamente en la adición de un diafragma anular

colocado debajo de la platina para iluminar el objeto con un cono de luz estrecho y una placa de difracción montada en el objetivo.

La fase relativa de luz desviada, saldrá $1/4$ de longitud de onda retrasado, si es capturada y cambiada con la introducción de un material retrasador de fase, en aquella parte de la placa de difracción que sea cubierta por cualquiera de los dos rayos, aumentando aún más, otro $1/4$ de longitud de onda y logrando retrasar el rayo luminoso en total $1/2$ longitud de onda, con lo que se consigue que este rayo quede totalmente fuera de fase con respecto a la luz no desviada.

Cuando la diferencia se presenta es porque los índices de refracción son diferentes y el microscopio de contraste de fase transforma estas variaciones en brillo o intensidad. Las estructuras celulares presentan muchas irregularidades y son objetos ópticamente no homogéneos; así, la luz que "choca" con el objeto se presenta desviada.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica usa un flujo de electrones en lugar de flujo luminoso. Como la longitud de onda del flujo electrónico es mucho menor que la de la luz, se pueden ver como separadas estructuras menores de $2\ \mu\text{m}$. Este tipo de microscopio se utiliza para el estudio de las características de superficie del polen y la imagen producida aparece tridimensional

Detección electrónica (método Coulter)

Se ha desarrollado un método para la detección y el recuento de polen basado en el principio del conteo "Coulter" (Zhang *et al*, 2005). Este método también proporciona información del tamaño y las cargas de las partículas analizadas, permitiendo distinguir preliminarmente el polen de otras micropartículas. Es posible detectar pulsos de corriente positivos y negativos en concentraciones de KCl. Esto es debido tanto al tamaño de la partícula como a la distribución superficial de cargas. A partir de los experimentos se demuestra que existe viabilidad para la detección de polen. El tamaño del polen se puede estimar

en una alta concentración de electrolito, mientras que las cargas pueden medirse en una baja concentración de electrolito. El número de pulsos por unidad de tiempo nos da el recuento aproximado de polen.

4.2.6.2. Detección de alérgenos.

Enfoque Isoeléctrico

Las separaciones por enfoque isoelectrico (IEF) están basadas en que la mayoría de las moléculas biológicas portan grupos de iones en su estructura original. A un pH dado, o en un rango de pH, estas cargas positivas y negativas se neutralizan, produciendo una carga neta nula y una incapacidad de migrar en un campo eléctrico. En el Enfoque Isoeléctrico se establece un gradiente de pH en un medio de poliacrilamida o agarosa y las moléculas introducidas en este medio migrarán de acuerdo a su carga superficial hasta que alcancen un pH al cual no haya carga neta. A este pH (pH isoelectrico o pI) los compuestos no pueden difundirse más y se quedan “enfocados” o condensados en una zona delimitada. Las diferencias en los tipos y cantidad de grupos de cargas de una molécula produce distintos valores de pI, y esto junto con las diferencias en la composición dan como resultado un único modelo de IEF o “huella dactilar” para muchas muestras cuando se visualizan una vez teñidas. Los valores de pI de los componentes de la muestra se estiman por el análisis de la regresión lineal de sus distancias de migración con respecto a las proteínas estándar de pI conocido. Hay perfiles de alérgenos estudiados para *Alternaria* (Wahl *et al*, 1989), *Ambrosía* (Pilyavskaya *et al*, 1995) y para *Phleum pratense* (Martínez *et al*, 1992).

Sds-Page

En este método, las moléculas son desnaturalizadas mediante el tratamiento con un detergente aniónico (SDS) y separadas mediante electroforesis en gel a un pH constante (García, 2000). Se forman complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de

bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa. Esta técnica se ha mostrado muy eficiente para el análisis de esporas de hongos (Portnoy *et al*, 1993) (Barnes *et al*, 1996) (Wahl *et al*, 1969) y para el de polen (Pilyavskaya *et al*, 1995) (Han *et al*, 1993) (van Ree *et al*, 1995)

Inmunoprecipitación e Immunoblotting

La inmunoprecipitación es una de las técnicas inmunológicas más útiles cuando se asocia a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. De este modo se pueden determinar la presencia y cantidad de un antígeno, el peso molecular relativo de una cadena polipeptídica, su síntesis y degradación, la interacción con proteínas, ácidos nucleicos u otros ligandos. La técnica de inmunoprecipitación se divide en cuatro pasos (Martínez *et al*, 1992), (Klysner *et al*, 1992) (Fahlbusch *et al*, 1998):

1. Marcaje del antígeno (opcional)
2. Lisis de las células para liberar el Ag (no siempre es necesario)
3. Formación del complejo Ag-Ac
4. Purificación de los inmunocomplejos

En la mayoría de los casos el antígeno se marca incubándolo con un precursor radiactivo aunque muchos antígenos se pueden detectar por medios que no requieren marcaje directo. El antígeno se extrae de las células mediante lisis. Después, los anticuerpos se añaden al lisado y se forman los inmunocomplejos Ag-Ac. Estos se unen por adsorción a una fase sólida que contiene proteína A.

Los inmunocomplejos se analizan generalmente por electroforesis en gel pero también pueden ser usados en diferentes técnicas incluyendo estudios enzimáticos, unión a ligandos, inmunizaciones, immunoblotting, etc.

Una de estas técnicas es el Western blot que combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmunoquímica. Se utiliza para determinar la presencia y cantidad de antígenos y de anticuerpos específicos.

CIE Y CRIE (Contraelectroforesis y Radiocontraelectroforesis)

La CIE combina la electroforesis en gel de agarosa en una dimensión con una inmunolectroforesis en otra dimensión. Es pues un ensayo bidimensional en el que el gel, que contiene anticuerpos contra el antígeno buscado, produce un modelo detallado de inmunoprecipitados. Se producen áreas-pico que están en relación directa con las concentraciones de antígeno reconocidas por los anticuerpos que se hallan en el gel.

La CRIE refleja las actividades de los precipitados por autorradiografía de geles CIE sin teñir después de incubar con suero humano alérgico y radioetiquetado con IgE anti-humano (Weeke *et al*, 1983)

Estos métodos se han empleado para el estudio de alérgenos de polen de hierba (Matthiesen *et al*, 1991)

Técnicas de EIA o ELISA

En las técnicas “Enzyme-linked immunosorbent assay”, abreviadamente ELISA (o EIA), un enzima conjugado a un anticuerpo reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto de reacción coloreado. Varios enzimas se han empleado para técnicas de ELISA, incluyendo a la fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, y la p-nitrofenil fosfatasa. Cuando es mezclada con el sustrato apropiado, cada uno de estos enzimas genera un producto de reacción coloreado.

Se han desarrollado variaciones del método, permitiendo la detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos. Cada uno de los tipos de ELISA es utilizable cualitativamente para la detección de la presencia de anticuerpo o de antígeno. Alternativamente, se prepara una curva standard basada en

concentraciones conocidas de anticuerpo o de antígeno a partir de la cual se puede determinar la concentración desconocida.

ELISA directo. (Ensayo ELISA simple de dos capas)

Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina,...) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido).

ELISA Indirecto

La técnica de ELISA-indirecto se utiliza para detectar o cuantificar anticuerpos. El suero u otra muestra que contiene el anticuerpo primario (Ab1) se añade a un pocillo microtiter revestido de antígeno. Después se procede a lavado para eliminar cualquier anticuerpo primario libre. Posteriormente se añade un enzima conjugado secundario anti-isotipo del anticuerpo (Ab2), el cual se une al anticuerpo primario. Se procede de nuevo a un lavado y por último se añade un sustrato para la enzima. El producto de reacción coloreado formado se mide por espectrofotometría.

ELISA Sandwich

Esta técnica permite la detección o cuantificación del antígeno. En este caso es el anticuerpo el inmovilizado en la cápsula microtiter. La muestra con antígenos se añade y se deja reaccionar con el anticuerpo enlazado. Después del lavado, un segundo anticuerpo unido a enzima específico para un epítipo diferente del antígeno se añade y se deja reaccionar con el antígeno enlazado. Después de un nuevo lavado se añade el sustrato y se mide el producto de reacción coloreado (Fahlbusch *et al*, 1998)

ELISA Competitivo

En esta técnica el anticuerpo se incuba primero en una solución con una muestra que contiene antígenos. La mezcla antígeno-anticuerpo se añade a un pocillo microtiter revestido de antígeno. Cuanto más antígeno haya presente en la mezcla, menos anticuerpo libre estará disponible para enlazarse a la pared del pocillo. Se puede utilizar un anticuerpo secundario conjugado con un enzima (Ab2) específico para el isotipo del anticuerpo primario para cuantificar la cantidad de anticuerpo primario unido a la pared como si de un ELISA-indirecto se tratase. En este método, a más concentración de antígeno menor absorbancia (CBER FDA, 1993)

RAST

El RAST (Radio immuno alergo sorbent test) se utiliza para la detección de IgE específica, ensayo altamente sensible y de gran precisión. El RAST más usado utiliza alérgenos insolubilizados en discos de celulosa a los cuales se une la IgE específica presente en el suero en estudio durante la primera incubación. Enseguida se agrega una anti-IgE marcada con un radioisótopo y se mide en un contador gamma la radioactividad unida al disco. Esta es directamente proporcional a la cantidad de IgE específica presente en la muestra, estableciéndose su concentración por comparación con una solución estándar de referencia. En los últimos años se han introducido numerosas variantes a la técnica de RAST original: diferentes tipos de fase sólida para fijar los alérgenos (disco de papel, superficie plástica, celulosa), diferentes marcadores para poner en evidencia la IgE unida (radioisótopos, enzimas), diferentes instrumentos para la lectura final. Actualmente no se pueden comparar los resultados obtenidos con estos diferentes inmunoensayos ya que existen diferencias en los extractos alérgicos que utilizan, la técnica de insolubilización de los alérgenos, el tiempo de incubación, el criterio para establecer cuando un resultado es negativo o positivo, entre otros.

RAST- inhibición

El test de Inhibición RAST se utiliza para determinar la potencia alérgica relativa de un producto con respecto a una preparación de referencia. En este método, una solución con anticuerpos anti-antígeno se preincuba con el producto supuestamente alérgico antes de ser continuado con el método RAST.

Cuanto más alérgico haya en la muestra más alta será la inhibición. (Poulsen, 2001)

En los últimos años se está produciendo un notable incremento en el estudio para la mejora de las técnicas de detección de alérgenos existentes y para la incorporación de otras nuevas que ha llevado a disponer de una enorme variedad de modificaciones en cuanto a soportes y técnicas entre las que cabe destacar:

- Inmunoensayo de radicales por resonancia de spin electrónico (Takahashi *et al*, 2007)
- Tests de aglutinación de Látex: gotas de látex se hacen reaccionar con anticuerpos anti-alérgico para formar gotas sensibilizadas que se hacen reaccionar posteriormente con muestras a analizar pasando después a verificar si se ha producido aglutinación (Takahashi *et al*, 2006)
- Detección en membranas PVDF: Se detectan los alérgenos y el polen por inmunoblotting directamente en las membranas de los captadores Burkard (Chakraborty *et al*, 1999)

4.2.7. Oleaceas (Oleaceae)

4.2.7.1. Características botánicas y distribución

La familia de las oleáceas (Oleaceae), engloba a unas 800 especies aproximadamente, agrupadas en unos 24 géneros. Se encuentra ampliamente distribuida por toda la cuenca mediterránea y algunas zonas de Norteamérica (California, Arizona) (Bousquet *et al*, 1985a y b), (Solomon *et al*, 1997), (Boluda,

1998), extendiéndose, en España, por toda la península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias.

Las oleaceas son angiospermas, del grupo de las dicotiledóneas (subclase Magnoliidae). Presentan una polinización mixta, aunque se cree que en realidad son entomófilas, así no tienen la necesidad de producir tanto polen y pueden reducir el número de estambres. En ciertos casos, como en los olivos, la cantidad de polen que pueden liberar, pese a tener solamente dos estambres, es muy elevada debido a que, por un lado, es cuantioso el número de flores, y por otro, porque parece haberse vuelto, al menos parcialmente, a un tipo de polinización primitiva en la que interviene el viento (Feo, 2000).

La subfamilia de las Oleideae está constituida por un número relativamente escaso de especies, e incluye a varios tipos de árboles y arbustos. En Europa, las más importantes, con diferencia, son *Fraxinus* (fresno) y *Olea* (Olivo y acebuche). Otras menos importantes son *Ligustrum* (aligustre), *Forsythia*, *Syringa* (lilas), *Jasminun* (jazmines) y *Phillyrea* (labiérnagos). En España, de todas ellas, solo tres contribuyen, significativamente, a la carga atmosférica de pólenes, el fresno (febrero-marzo), el olivo (abril-junio) y el aligustre (julio), aunque este último, que es utilizado como ornamental, produce muy escasos síntomas sólo en situaciones de exposición local, tal y como ocurre en las podas (Subiza *et al*, 1998).

En Europa, el olivo se observa casi exclusivamente en la cuenca mediterránea, en los bosques y matorrales de las regiones secas y rocosas (Spieksma *et al*, 1993), mientras que otras oleáceas como *Fraxinus* y *Ligustrum* también están presentes en la Europa septentrional, con una estacionalidad que experimenta un desfase de aproximadamente un mes (Corsico, 1993). Sin embargo, aunque el área de distribución geográfica de *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum lucidum* o *Phillyrea angustifolia* es mucho mayor que la de *Olea europaea*, su peligrosidad como alérgeno es menor y, por tanto, también lo es su incidencia en la alergia (Bousquet *et al*, 1985a y b). De este modo, clínicamente, *Olea* puede y debe ser considerada como único representante de las Oleideae, al

ser un importante inductor de enfermedades alérgicas en toda la cuenca del mediterráneo (Melillo *et al*, 1985), siendo el responsable de hasta un 65% de sensibilizaciones, solo o bien asociados a otros pólenes (sobre todo de gramíneas). Además, contiene todos los alérgenos de las demás especies de oleáceas, aparte de los suyos propios y específicos (Tornero, 1990)

En España, el olivo se extiende por toda la cuenca mediterránea, de tal manera que con frecuencia se considera como un buen indicador del clima mediterráneo y de los límites de la vegetación de tipo mediterráneo (Feo, 2000). El olivo se extiende desde las Islas Baleares, donde es abundante, y se reparte por la mitad meridional y este de la Península, hasta Cataluña, penetra por el Centro hasta las laderas rocosas de las riberas del Tajo. Cultivado, su área de extensión es mayor, debido a que su alto aprovechamiento del terreno, el bajo coste de su explotación, y el hecho de ser muy resistente a las altas temperaturas y a la sequía le convierte en el cultivo por excelencia de amplias zonas de Andalucía, Castilla-La Mancha o Extremadura. Sin embargo, en el interior peninsular, los inviernos rigurosos producen grandes daños en las plantaciones (Feo, 2000). La distribución del olivo va perdiendo importancia según avanzamos al norte, siendo tan sólo testimonial en el macizo galaico y cornisa cantábrica (Subiza *et al*, 1998). Son especialmente notables los acebuchares de las provincias de Cádiz y Huelva (Feo, 2000)

El Olivar no es un cultivo intensivo en nuestra área. Los cultivos existentes por orden de importancia son: dentro de los hortícolas, la lechuga, el brócoli, el melón y la alcachofa; en los cítricos destacan el limonero y el naranjo, y otros cultivos de invernadero: destacamos el pimiento y los cultivos de flor cortada. La casi totalidad de la superficie emplea la técnica de riego localizado (Alcón, 2006). En el Campo de Cartagena, los cultivos de secano fueron los más abundantes hasta mediados del siglo pasado, momento en que empezaron a sustituirse por regadíos abastecidos con aguas subterráneas y del trasvase Tajo-Segura. Los cultivos de secano ocupan la mitad occidental del municipio, mientras que los regadíos se localizan en la zona oriental. Entre los primeros, cabe destacar los campos cerealistas y cultivos de almendros, algarrobos, olivos e

higueras. Más escasos son los granados que suelen aparecer junto a casas de campo y zonas marginales de cultivo. Los regadíos están constituidos por cítricos, legumbres y hortalizas (lechugas, melones, alcachofas, tomates, etc.), cultivos industriales (pimiento y algodón), especies forrajeras y plantas ornamentales. (Ayuntamiento de Cartagena, 2009). El olivar pasó de ocupar un 7,8% de las tierras cultivadas de Murcia en 1950 a un 2% en 1987. A mediados del siglo XX suponía un tercio del arbolado y actualmente representa el 5,6%, por lo que se considera un cultivo en retroceso (Espejo, 1989). El impulso de la agricultura ecológica sí ha supuesto un incremento de los olivares en la zona noroeste de la comunidad autónoma de la Región de Murcia (Altiplano, valle de Guadalentín y Abanilla) desde 1996 (Teruel, 2006).

El uso ornamental de *Olea* está muy extendido en nuestra comunidad autónoma (Negro *et al*, 2004), formando parte de arbolado ornamental usado en parques, jardines, rotondas y zonas turísticas residenciales.

4.2.7.2. *Olea europaea*

Descripción: El olivo (*Olea europaea*) es un árbol que puede alcanzar hasta los 10 metros de altura. Su tronco es grueso, presenta numerosos nudos y está muy retorcido; la corteza es de color pardo grisácea. Las hojas son perennes, con forma lanceolada, que pueden medir de 2 a 8 cm de longitud; el haz de estas es verde-grisáceo mientras que el envés es de color plateado.

Las flores son hermafroditas (raramente unisexuales), muy pequeñas que forman numerosos racimos, blanquecinas y poco vistosas. El cáliz es de una sola pieza, persistente, con 4 lóbulos o dientes, que van a modo de valva en el capullo. La corola está constituida por 4 pétalos soldados en tubo (estructura tubular-embudada), es hipocraterimorfa (con un tubo largo, delgado, y los lóbulos casi horizontales) y caduca. Esta flor tiene dos estambres (que alternan con los pétalos, unidos por lo general al tubo de la corola) con unos filamentos generalmente cortos y anteras con dos cavidades. El pistilo está formado por dos hojas carpelares soldadas; un ovario súpero, rodeado en la base, a veces por un disco nectarífero, con dos cavidades (cada una con 2 o más rudimentos seminales

colgantes), con una sola envuelta o tegumento, unidos a placentas situadas en el eje o en el ápice; y un estilo simple, terminal, con estigma entero, bilobado o bífido. El perianto es doble.

La aceituna, fruto del olivo, es de tamaño pequeño, de forma elipsoidal a globosa según variedades. Botánicamente la aceituna es una drupa como la ciruela o melocotón. Se trata de un fruto con una sola semilla compuesto por tres tejidos principales: endocarpo, mesocarpo y exocarpo. El endocarpo es el hueso en cuyo interior se encuentra la semilla, el mesocarpo la pulpa o carne y exocarpo la piel o capa exterior. De ella se extrae el aceite.

Ecología y distribución: Los olivos se hallan ampliamente cultivados en toda el área Mediterránea, sobre todo en el sur de la Península Ibérica, donde su cultivo ha experimentado un fuerte aumento propiciado por la gran demanda de aceite de oliva a nivel mundial. Se localiza en cultivos monoespecíficos y en las provincias de Granada y Jaén ocupan más del 50% de la superficie agrícola. Se desarrollan sobre cualquier tipo de suelo y se distribuye en un amplio gradiente altitudinal desde la franja costera hasta las zonas montañosas del interior de estas provincias. El acebuche aparece en determinadas zonas formando parte de la vegetación natural.

Floración: Florece durante un período relativamente corto, que se extiende desde abril hasta junio. No obstante se caracteriza por tener una floración muy explosiva, lo que unido al gran número de ejemplares cultivados, provocan un intenso período de polinización.

Alergenicidad: Numerosos autores consideran a este polen como uno de los aeroalérgenos más importantes del área Mediterránea. Concretamente, en la mayoría de las ciudades andaluzas ha sido descrito como la principal causa de polinosis, observándose además un aumento considerable del número de sensibilizaciones durante los últimos años. En Granada, hasta un 75% de los enfermos de polinosis presentan algún tipo de sensibilidad a este polen; entre la población infantil, afecta a más de un 80%. En la provincia de Jaén se confirma un alto porcentaje de pacientes con sintomatología a este polen que se sitúa en

torno al 84%. En Almería el polen de olivo es el aeroalérgeno que provoca mayor número de casos de alergia, estimándose que más del 60% de la población con problemas de polinosis presentan positividad en los tests cutáneos (Universidad de Granada, 2009)

Estacionalidad: Los primeros registros polínicos comienzan a detectarse durante el mes de marzo en las zonas más termicas de Andalucía oriental, y a partir de abril es cuando se inicia la polinización en las del interior. Las concentraciones más elevadas se obtienen desde la primera semana de mayo, siendo generalmente durante la segunda semana de este mes cuando se alcanzan los niveles máximos en Almería y Jaén, retrasándose a la tercera o cuarta semana en Granada. Hasta bien entrado el mes de junio se mantienen los valores importantes de polen de olivo en el aire, extendiéndose, en ocasiones, la polinización de estos árboles incluso durante el mes de julio (Universidad de Granada, 2009)

El olivo crece de forma natural en los bosques esclerófilos mediterráneos (encinares, alcornocales, quejigares) o en los matorrales que resultan de su degradación (junto al lentisco, mirto, palmito y espino negro), en todo tipo de terrenos. Aguanta muy bien el calor y la sequía, pero es sensible al frío (no tolera temperaturas inferiores a -9°C o una temperatura media de sólo 3°C durante el mes más frío). Al penetrar hacia el interior de la Península no sube mucho su altitud, refugiándose en las laderas más soleadas y más abrigadas del frío; crece en altitud desde el nivel del mar hasta unos 1.500 m (Universidad de Granada, 2009)

En la Península Ibérica e Islas Baleares hay una sola especie del género *Olea*, representada por una raza denominada *Olea europaea*, que tiene dos variedades, la *Olea europaea* (olivo cultivado) y la *Olea sylvestris* (olivo silvestre o acebuche). En las Islas Canarias hay, además, una raza africana de olivo llamada *Olea europaea* subespecie africana (Feo, 2000)

4.2.7.3. Morfología polínica

Polen trizonocolporado; isopolar; con simetría radial; circular o ligeramente elíptico en visión polar; subtriangular en visión ecuatorial; prolato-esferoidal. Tamaño pequeño o mediano (P=20-27 micras; E=19-31 micras); membrana apertural psilada. Exina gruesa de 2-2,5 micras de grosor, con sexina aproximadamente dos veces más gruesa que la nexina, y una intina fina con uncus. Téctum parcial; infratéctum columelado, con columelas simples. Superficie reticulada, con lúmenes irregulares tan anchos o más anchos que los muros; muros verrucosos.

4.2.8. Base inmunológica y molecular de la alergia. Breve introducción a la inmunología

Etimológicamente la palabra inmune/inmunidad proviene del latín *immunis/inmunitas* formada del prefijo de negación *in-* y *munis/munitas* (hacer un servicio), es decir “sin hacer servicio”. En el siglo XIV, inmune sólo se refería a la excepción de servicio públicos (impuestos, servicio militar, etc...) o castigos. No fue hasta 1879 que Louis Pasteur (1822-1895) usó la palabra inmune para referirse a la excepción de enfermedades.

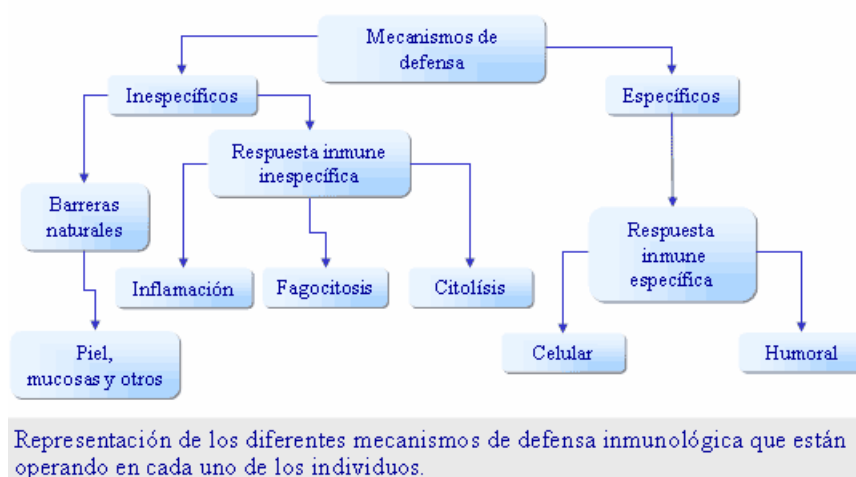
Los mamíferos defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, procedentes del exterior así como del propio organismo. De no ser así, morirían como consecuencia de tumores e infecciones por bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como *sistema inmune*. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno.

La inmunología es la ciencia que estudia los procesos moleculares y celulares implicados en la defensa de la integridad biológica del organismo a través de la identificación de sustancias propias y detección de las extrañas y su destrucción. Los mecanismos de defensa pueden ser de tipo específico e inespecífico. Los mecanismos inespecíficos están constituidos por las barreras

naturales (tales como la piel, mucosas y secreciones tales como saliva, lágrimas y moco que presentan lisozima capaz de romper los enlaces del peptidoglicano de las paredes bacterianas con la consiguiente posibilidad de lisis celular) y por la respuesta inmune inespecífica, constituida fundamentalmente por componentes de la respuesta inmune específica (Peña *et al*, 2003).

En personas sanas hay un balance fisiológico entre la cantidad y el estado funcional del sistema inmunitario mediado por células. En la reacción alérgica esta proporción se altera (Puc, 2003)

Figura 4. 10 Mecanismos de defensa
(Peña *et al*, 2003)



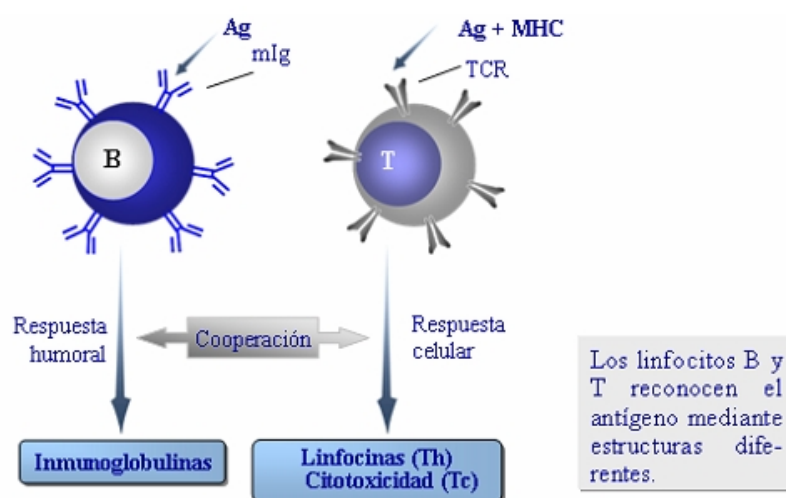
La *respuesta inmune inespecífica* es la primera barrera defensiva, después de las barreras naturales del organismo, y no requiere sensibilización previa. Este tipo de respuesta es mediada por células con capacidad fagocítica y células asesinas naturales que producen citólisis. Las células que mediatizan esta respuesta son las células polimorfonucleares neutrófilas, macrófagos y las células NK (células asesinas o natural killers) las cuales se activan de forma inmediata cuando una sustancia extraña penetra en el organismo como, por ejemplo, tras una herida. En este tipo de respuesta también participa el complemento, que está formado por una gran variedad de proteínas del plasma. Probablemente la fagocitosis es el principal elemento que actúa en este tipo de respuesta (Peña *et al*, 2003).

La *respuesta inmune específica o adquirida* se desarrolla solo frente a la sustancia que indujo su iniciación. Puede ser de dos tipos:

- Celular, en la que están implicadas células del tipo linfocitos B y T, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, células plasmáticas y otras. Los linfocitos T pueden a su vez ser Tc (citotóxicos) y Th (helpers o colaboradores) y estos a su vez Th1 y Th2
- Humoral, en la que están implicados principalmente los linfocitos B, productores de anticuerpos

Para que se inicie la respuesta inmune específica, se requiere el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos y subsiguiente activación de los mismos. Los linfocitos B reconocen el antígeno mediante inmunoglobulinas de membrana (IgM) mientras que los linfocitos T lo reconocen mediante el receptor de linfocitos T (TCR). El reconocimiento antigénico y las respuestas se pueden esquematizar como sigue:

Figura 4. 11 Reconocimiento antigénico. Respuestas humoral y celular (Peña *et al*, 2003)



En la respuesta inmune celular, para que los linfocitos T puedan reconocer al antígeno, este debe ser debidamente presentado. Esta función se realiza por las células presentadoras de antígeno (APC) que transportan a este en el seno de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC,

glicoproteínas de membrana de la mayoría de células nucleadas, entre las que se encuentran las inmunocompetentes) con la parte inmunógena orientada hacia el linfocito T.

La respuesta inmune es regulada por moléculas conocidas como linfocinas, que son sustancias producidas por linfocitos en respuesta a una gran variedad de estímulos y que son capaces de regular el funcionamiento de otras células del sistema inmune. Las linfocinas actúan como señal complementaria facilitando la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos y en general de todas las células implicadas en la respuesta inmune. Como consecuencia de estos eventos se producirá finalmente la transcripción de los genes implicados en la síntesis de proteínas y factores implicados en las funciones inmunitarias. La activación de las células Th es el núcleo central de la respuesta celular que a su vez actúa sobre macrófagos, células NK y linfocitos Tc que adquieren entonces la capacidad de lisar las células que portan el antígeno que indujo su activación.

En la respuesta inmune humoral intervienen los linfocitos B que reconocen al antígeno a través de las inmunoglobulinas de membrana. Sin embargo este estímulo no es suficiente para que se inicie y desarrolle la respuesta inmune humoral. Los linfocitos B han de recibir además el estímulo de citocinas producidas por los linfocitos Th. Solamente cuando confluyen el estímulo antigénico y el mediado por citocinas se produce la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B hasta la formación de células de la memoria y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, que serán el elemento final de la respuesta humoral.

Las principales características de la respuesta inmune específica vienen dadas según la tabla siguiente (Peña *et al*, 2003):

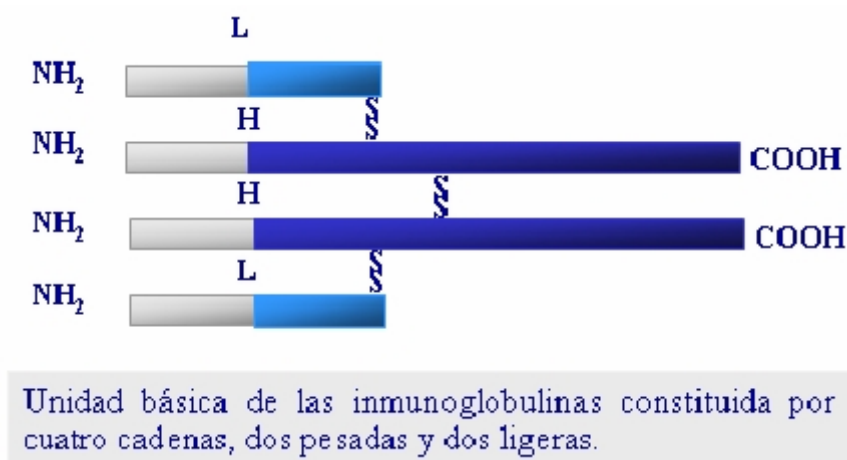
Tabla 4. 6 Características respuesta inmune específica

Especificidad	Cada antígeno estimula solo a los receptores capaces de reconocerlo
Clonalidad	Un linfocito o grupo de linfocitos prolifera al ser activado por el antígeno en múltiples células con idénticos receptores de superficie
Memoria Inmunológica	Respuesta a partir del segundo estímulo de la misma índole debido a la permanencia de linfocitos de larga vida sensibles al mismo antígeno
Autorregulación	La intensidad de la respuesta se regula por diversos tipos de moléculas como inmunoglobulinas y citocinas

Generalmente el sistema inmune responde de forma unitaria, por lo que la división en respuesta inespecífica y específica es más teórica que real. Lo que sí ocurre es que, dependiendo de las circunstancias, en unos casos predomina una u otra de estas formas de respuesta (Lara *et al*, 2010).

Las inmunoglobulinas son el producto resultante de la estimulación de una respuesta inmune humoral. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que, según ya indicó Porter (Porter, 1972), están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas, dependiendo del tipo de inmunoglobulina, en una o varias unidades estructurales básicas. Cada unidad estructural básica está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente:

Figura 4. 12 Unidad básica de inmunoglobulina.
(Peña *et al*, 2003)



Tras la ruptura de los puentes disulfuro se individualizan cuatro cadenas polipeptídicas que, atendiendo a su tamaño, son de dos tipos: de bajo peso molecular (aproximadamente 22 KD) y de alto peso molecular (50-70 KD, dependiendo del tipo de Ig). Los polipéptidos de bajo peso molecular reciben el nombre de cadenas ligeras o “L” (Light) y las de alto peso molecular, cadenas pesadas o “H” (Heavy). Hay dos tipos de cadenas ligeras, las de tipo kappa (κ) y las de tipo lambda (λ). En cada molécula de inmunoglobulina las dos cadenas ligeras son del mismo tipo, κ o bien λ , pero nunca existe una de cada tipo en la misma inmunoglobulina.

Tras la ruptura con papaína de las cadenas H a nivel del puente disulfuro se obtienen tres fragmentos: uno denominado F_C que determina la actividad biológica, contiene el alotipo y determina la clase de cadena pesada y otros dos denominados cada uno Fab, que es por donde la molécula se une al antígeno.

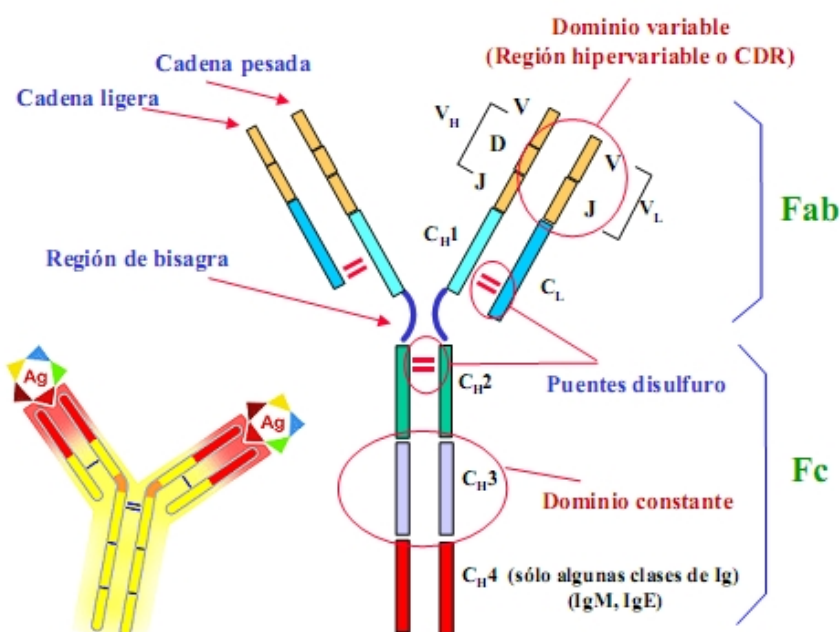
Las cadenas ligeras están formadas por unos 200 aminoácidos con 2 puentes disulfuro que unen grupos de unos 50 aminoácidos. A su vez, estas cadenas ligeras tienen otro puente disulfuro intercatenario por el cual cada una de ellas se une a una cadena pesada para formar la unidad básica.

Las cadenas pesadas poseen unos 400 aminoácidos estableciéndose entre algunos de ellos puentes disulfuro intracatenarios que asocian unos 60

aminoácidos y que condicionan la estructura secundaria del polipéptido. Las dos cadenas pesadas están unidas por medio de uno a cinco puentes disulfuro. A nivel de los puentes disulfuro de estas cadenas hay una zona de unos quince aminoácidos llamada “zona bisagra” por donde la molécula se deforma cuando se produce la unión con el antígeno, facilitándose el acoplamiento con este.

Las cadenas ligeras poseen dos partes: un extremo carboxílico que diferencia las cadenas ligeras en los tipos κ y λ , y forma la parte constante de las cadenas ligeras (región o dominio C_L). La otra corresponde al extremo amínico, que debido a su variabilidad constituye la parte variable de las cadenas ligeras (región o dominio V_L) y corresponde a la zona de interacción con el antígeno. Ambas partes son aproximadamente del mismo tamaño.

Figura 4. 13 Inmunoglobulina, esquema.
(Sánchez-Vizcaíno, 2004)



Las cadenas pesadas también poseen parte variable y constante. Aproximadamente el tercio amínico de estas cadenas es muy variable (V_H). La estructura de este fragmento, al igual que en las cadenas ligeras, depende del tipo de antígeno que reconoce. Aproximadamente los dos tercios del extremo

carboxílico de todas las cadenas pesadas de un mismo tipo de inmunoglobulinas poseen una estructura idéntica. Esta parte se conoce como parte constante de las cadenas pesadas (C_H)

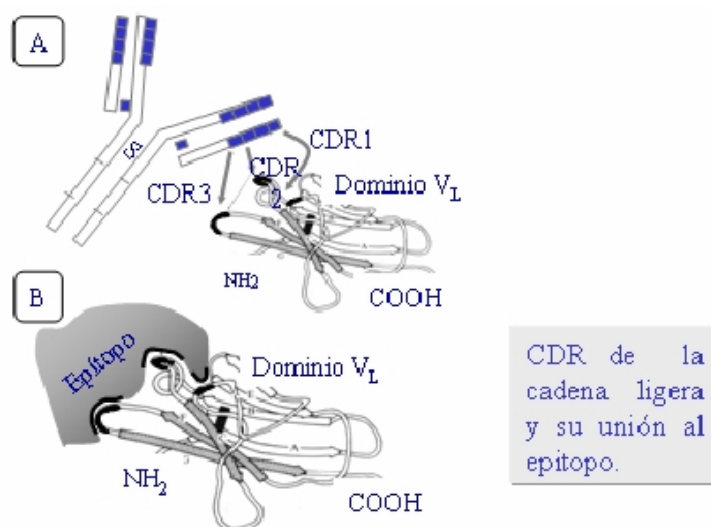
La parte constante es distinta según la clase de inmunoglobulina que consideremos, determinando la existencia de cinco tipos de cadenas pesadas: g, a, m, d y e que definen a su vez las cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE respectivamente (Peña *et al*, 2003).

Los dominios variables, tanto de la cadena L como H, poseen a su vez unas regiones en donde se concentra fundamentalmente la variabilidad. Son tres pequeños segmentos que constituyen las denominadas regiones o segmentos hipervariables o región determinante de complementariedad CDR (Complementarity Determining Region), pues determinan la forma del centro activo que permite el reconocimiento y unión al antígeno. Cada una de estas regiones hipervariables se componen de 17 a 20 aminoácidos y cambios en muy pocos aminoácidos suponen una enorme diversidad de posibilidades de unión al antígeno sin variar el resto de la molécula.

Las inmunoglobulinas pueden estar constituidas por unidades básicas simples, como es el caso de la IgG, IgD e IgE, en forma de dímeros, como es el caso de la IgA, o incluso por hasta cinco estructuras básicas unidas por sus extremos F_C como es el caso de las IgM.

Cada uno de los dominios (variable y constante) está constituido a modo de “cilindros” en los que se encuentran plegado en forma de sándwich dos grupos de cadenas proteicas, una con tres cadenas polipeptídicas y la otra con cuatro, que presentan estructuras secundarias de hoja plegada β . Estas dos capas proteicas están alineadas paralelamente rodeando un espacio interior en el que predomina la presencia de aminoácidos hidrófobos.

Figura 4. 14 CDR y unión al epítipo.
(Peña *et al*, 2003)



La unión de esas dos capas se efectúa por puentes disulfuro. En las zonas constantes, las capas de cuatro segmentos están en el exterior de la molécula y la de tres en el interior, mientras que en las variables es al contrario; por lo demás, el modelo global de plegado guarda gran semejanza entre los dominios variables y constantes. Sin embargo, las regiones hipervariables constituyen tres bucles adicionales que no se someten al plegamiento del resto del dominio

La función esencial de las inmunoglobulinas es la de unirse al antígeno. De esta forma actúan como receptoras de señales antigénicas o bien pueden colaborar en la destrucción antigénica. La primera función se presenta cuando las inmunoglobulinas se encuentran insertas en la membrana de los linfocitos B y para la segunda requieren la colaboración del complemento, macrófagos, neutrófilos y células NK, que tienen la propiedad de unir las inmunoglobulinas por su extremo F_C.

La unión del antígeno (Ag) con el anticuerpo (Ac) o inmunoglobulina es similar a la del enzima con su sustrato. Estas uniones se deben a la formación de enlaces no covalentes (puentes de Hidrógeno, interacciones electrostáticas,

fuerzas de Van der Waals e hidrófobas), cada uno de los cuales por sí solos son débiles, pero cuando son múltiples, la fuerza total puede ser muy elevada.

La unión Ag-Ac es muy compleja puesto que cada uno de los antígenos poseen varios epítomos distintos, por lo que podrán unir mas de un anticuerpo. Cada molécula de anticuerpo, por su parte, puede unir al menos dos moléculas de antígeno, una por cada F_{ab} y en el caso de la IgM hasta diez moléculas. En un antígeno, un determinado epítomo puede estar representado varias veces siendo capaz de unir varias moléculas del mismo anticuerpo. La fuerza total de la interacción que considera todas las interacciones entre el epítomo y el paratopo (zona de unión al epítomo) que tienen lugar entre antígenos y anticuerpos multivalentes se denomina “avidez” y es mucho mayor que la suma de las afinidades.

La unión entre el antígeno y la inmunoglobulina es de gran especificidad, de tal manera que una inmunoglobulina se unirá fundamentalmente y con mayor avidez, a un antígeno determinado. En algunos casos la inmunoglobulina podrá unirse a antígenos con epítomos muy similares, aunque en este caso la afinidad de la unión es mucho menor. También es posible que un mismo epítomo se encuentre con dos antígenos diferentes en cuyo caso el anticuerpo reaccionará con los dos antígenos, diciéndose entonces que existe una reactividad cruzada.

Al producirse la unión de antígeno e inmunoglobulina G se producen una serie de cambios alostéricos en el extremo Fc de la IgG que hacen que se una a receptores que se encuentran en la membrana de macrófagos y polimorfonucleares. A este fenómeno se le denomina “Opsonización”. Los macrófagos se activan, iniciándose la fagocitosis y subsiguiente destrucción de los complejos antígeno-anticuerpo por los procesos líticos intracelulares.

Cuando la inmunoglobulina que se une a un antígeno es de las clases IgM o IgG, los cambios alostéricos que se producen en sus extremos Fc dan lugar a la fijación y activación de uno de los componentes del complemento, lo cual conlleva finalmente a la lisis celular, fenómeno conocido como “citotoxicidad mediada por el complemento”.

Las inmunoglobulinas se encuentran distribuidas en todos los fluidos orgánicos de los vertebrados y en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas. Las cantidades relativas de cada una de las clases de inmunoglobulinas en el torrente sanguíneo son las siguientes (Peña *et al*, 2003):

Tabla 4. 7 Conc. de inmunoglobulinas en suero adulto normal (mg/100mL)
(Peña *et al*, 2003)

Ig	Concentración	Nivel inferior	Nivel superior
IgG	1250	950	1550
IgM	90	70	110
IgA	210	160	260
IgE*	0,0004	0,0002	0,0006
IgD	0,2	0,1	0,3
*En unidades Internacionales, UI (1 UI=2,3 mg/mL de IgE)			

Tabla 4. 8 Principales funciones de las inmunoglobulinas
(Peña *et al*, 2003)

IgG	Aglutinación de anticuerpos contra polisacáridos microbianos
IgM	Aglutinación de anticuerpos
IgA	Impiden la adherencia de las bacterias de la superficie de las mucosas; inhiben la motilidad bacteriana; neutralizan endotoxinas y virus
IgE	Reacciones alérgicas agudas y actúan contra microorganismos de tipo helmíntico
IgD	Su función aún no está clara

Al ponerse por primera vez un antígeno en contacto con un organismo se produce una respuesta inmune que se denomina primaria. Por el contrario, al

ponerse ese mismo antígeno en contacto por segunda vez se produce una respuesta inmune secundaria o adaptativa. Las principales diferencias entre ambas respuestas son:

Tabla 4. 9 Diferencias entre respuestas inmunes
(Peña *et al*, 2003)

Respuesta inmune primaria	Respuesta inmune secundaria
Nivel máximo de Igs después de un largo período de latencia	Niveles máximos de Igs se alcanza rápidamente
Respuesta de baja intensidad	Alta intensidad de respuesta
Predomina la IgM	Predomina la IgG
Vida media de Igs corta	Vida media de Igs larga

La Inmunoglobulina E se presenta en grandes cantidades en individuos atópicos. El estímulo para su síntesis puede proceder de una gran variedad de antígenos, a los que en este caso se conocen como alérgenos. Estos alérgenos pueden penetrar en el organismo a través de la piel o de las mucosas (respiratoria, ocular, digestiva, etc...), así como por inyectables.

La vida media de la IgE en sangre periférica es de 24-48 horas. No tiene capacidad de atravesar la placenta, por lo tanto, las reacciones de hipersensibilidad inmediata no pueden transferirse de manera pasiva de la madre al feto. Sin embargo, puede existir una predisposición de tipo familiar a padecer enfermedades de naturaleza alérgica.

La IgE se encuentra en forma libre en sangre y en otros líquidos biológicos así como unida a basófilos y células cebadas por su extremo Fc. Su concentración en sangre varía con la edad. Las personas alérgicas producen, precozmente, desde los primeros años de su vida, IgE específica para determinados alérgenos como respuesta al contacto entre el alérgeno y las mucosas, proceso denominado sensibilización. Los valores normales de IgE se dan a continuación

Tabla 4. 10 Valores normales de IgE(Niederberger *et al*, 2001)

Edad	U/mL
Hasta 1 año	1 – 10
1 a 3 años	10 – 20
4 a 6 años	20 – 35
7 a 9 años	35 – 50
A partir de 10 años	50 – 100
UI = 2,3 ng	

4.2.8.1. Origen de la alergia

La alergia tiene un alto componente hereditario. Si ningún miembro de la familia tiene historial alérgico, hay un riesgo del 5% de que el niño sea atópico. Sin embargo, si ambos padres tienen enfermedad alérgica, sobre todo si es desde hace mucho tiempo e incluye varios procesos, como asma, eczemas y rinitis, el riesgo se aproxima al 75%. Se ha sugerido que se hereda más la atopía por parte de la madre que del padre (Eseverri *et al*, 2004). Se sabe que los niveles de IgE en la sangre del cordón umbilical tienen un valor predictivo para la enfermedad alérgica. En este sentido, los niños que presentan niveles altos de IgE en el cordón umbilical al nacer tienen un 97% de probabilidad de desarrollar la enfermedad alérgica (Navarro, 2006)

En el desencadenamiento de la enfermedad alérgica, aparte de los factores genéticos, existen factores ambientales de riesgo. Así, la concentración de ácaros en el microambiente del paciente, lo mismo que la de otros aeroalérgenos como la presencia de animales en el hogar, clase social, intervenciones quirúrgicas (amigdalectomía), estenosis pilórica, contaminación ambiental, clima, edad, sexo, infecciones respiratorias, hábito tabáquico, fumadores pasivos, factores durante el

embarazo (alimentos, medicamentos), fecha de nacimiento, alimentos con alto poder alergénico e inmigración son desencadenantes exógenos que se han relacionado con las enfermedades alérgicas. Hoy se sabe que los niños que nacen en primavera, cuando hay más exposición al antígeno de los pólenes, tienen mayor propensión para desarrollar alergias frente a esos antígenos que los nacidos en otras estaciones (Castillo, 1995).

La dieta materna es importante durante la lactancia; hay estudios que demuestran que durante el período de lactancia materna y durante unos meses posteriores hay una reducción de la incidencia de eczema si se limita la ingesta de leche y huevo. Se ha demostrado, asimismo, que el tabaquismo de la madre (no del padre) está asociado con altos niveles de IgE en la sangre del cordón umbilical y con una mayor incidencia de enfermedad atópica a los 18 meses (Sierra, 2000). Una exposición precoz a animales domésticos, ácaros del polvo o proteínas heterólogas por ingestión prematura de ciertos alimentos puede aumentar el riesgo de enfermedad alérgica. Si a estos factores se añaden los genéticos citados en el apartado anterior, la probabilidad de padecer alergia se incrementa notablemente (Romero, 2002).

La prevalencia de la rinitis y asma alérgicas ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años en los países industrializados de todo el mundo, pero las diferencias metodológicas dificultan su valoración (García, 1999). Para explicar este fenómeno se ha propuesto que la falta de exposición a algunos estímulos infecciosos durante los primeros años de vida hace que en la respuesta inmune del individuo genéticamente susceptible predominen los linfocitos Th2 encargados de estimular las respuestas alérgicas. Esto se conoce como “Hipótesis de la higiene” (Sarrazola *et al*, 2003)

La primera respuesta inmunológica al alérgeno, en el caso de las alergias respiratorias, está provocada por pequeñas cantidades (nanogramos) de alérgenos liberados por partículas transportadoras (por ejemplo, polen) a nivel de las superficies de las mucosas (Niederberger *et al*, 2001). Estudios llevados a cabo en ratones señalan que las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, las células

dendríticas del sistema inmune, llamadas así por su semejanza con las células nerviosas –formadas por un cuerpo celular y varias prolongaciones-, y que tienen la misión de poner en marcha las defensas del organismo contra los cuerpos extraños) lo capturan y activan a los Linfocitos T específicos que, a su vez, activan a los linfocitos B específicos por medio de un estrecho contacto celular. Las células dendríticas son un poderoso estímulo para los linfocitos Th2, los cuales, a través de la producción de citocinas como las interleucinas (IL-3 e IL-4) inducen la estimulación de linfocitos B con la consiguiente producción de IgE. (Romagnani, 2000)

4.2.8.2. Mecanismo de desarrollo de polinosis

La respuesta alérgica se desarrolla cuando el sistema inmunitario, responsable de la correcta reacción de defensa contra los agentes medioambientales, se ve alterado. La inmunidad natural del organismo humano es el resultado de una inmunidad congénita y de una inmunidad adquirida mediante el contacto con antígenos medioambientales (Puc, 2003)

Cuando el grano de polen alcanza las mucosas del individuo atópico, los linfocitos B que se encuentran próximos a la vía de entrada se estimulan con la colaboración de los linfocitos T y producen anticuerpos IgE. Estos se fijan a los mastocitos de los tejidos circundantes y, pasando a la sangre, se unen a los basófilos, que los llevarán a otros tejidos. Este proceso se llama de “sensibilización”. Si un individuo sensibilizado se pone de nuevo en contacto con el antígeno, se forma un complejo antígeno-anticuerpo que provoca cambios intracelulares en los mastocitos y basófilos, dando lugar a la liberación de mediadores farmacológicos, responsables de la inflamación, reacción típica de la hipersensibilidad tipo I.

Las manifestaciones clínicas de la polinosis varían desde síntomas catarrales leves a procesos asmáticos graves, pasando por rinoconjuntivitis de diversa intensidad.

Se ha demostrado la influencia de ciertos factores que participan en el desarrollo de la polinosis como son: la contaminación atmosférica, el entorno ambiental, exposición temprana al alérgeno, etc... Es patente la prevalencia de polinosis en el medio urbano respecto al rural, achacable en parte a las partículas contaminantes, que pueden influir exacerbando o modificando el carácter alergógeno de los granos de polen.

De acuerdo con la clasificación propuesta por Gell y Coombs hay cuatro tipos de reacciones alérgicas (Gell *et al*, 1963):

• **Tipo 1** (Inmediata, anafiláctica), es la que se observa más a menudo en la polinosis; se desarrolla cuando el alérgeno estimula al organismo para producir anticuerpos específicos pertenecientes a inmunoglobulinas de clase E (IgE). Estos anticuerpos se unen específicamente a la superficie de los mastocitos y basófilos y los estimulan para la liberación de mediadores inflamatorios (fase temprana de la alergia). Cuando el organismo está todavía expuesto al alérgeno, la fase tardía de la reacción alérgica tipo I se desarrolla seguida de inflamación crónica. En esta fase la secreción de mediadores inflamatorios puede ser inducida no solo por el alérgeno específico que ha disparado la reacción, sino también por estímulos inespecíficos, por ejemplo agentes químicos (pesticidas, formaldehído, fenol) o factores físicos (esfuerzos, descenso de temperatura o aumento de presión).

Los síntomas clínicos observados en las reacciones alérgicas tipo I son: picor de nariz, estornudos, quemazón, producción de moco, y conjuntivitis. Este tipo de reacción alérgica puede conducir también al shock anafiláctico, urticaria, inflamación, o a formas de asma bronquial. Son reacciones típicas de origen genético, IgE-dependientes, conocidas como atópicas.

• **Tipo 2** (citotóxica), la reacción alérgica se desarrolla cuando el proceso se acompaña de la aparición de anticuerpos específicos, usualmente IgG o IgM. Los anticuerpos reaccionan con los alérgenos en la superficie de

las membranas celulares (células sanguíneas o de la médula ósea), con su consecuente descomposición.

- **Tipo 3.** La reacción alérgica tiene lugar cuando el alérgeno reacciona con inmunoglobulinas de tipo IgG, IgM, IgA o IgE formando complejos inmunes, los cuales se depositan en tejidos iniciando inflamaciones. Las reacciones Tipo 3 son a menudo causadas por drogas, sueros extraños, productos alimenticios y polvo orgánico o inorgánico.

- **Tipo 4,** hipersensibilidad retardada. Son los linfocitos T los principales implicados en esta reacción celular, secretando citocinas que disparan una reacción inflamatoria en los tejidos. Recientes estudios han indicado la posibilidad de que las IgE estén implicadas en este tipo de alergia

4.2.8.3. Antígenos.

Una molécula cuya estructura y composición es tal que puede ser reconocida por anticuerpos o por células inmunitarias en los mamíferos es llamada “antígeno”. Es generalmente externa y extraña al organismo y, una vez reconocida por receptores para antígeno en linfocitos T (TcR), en linfocitos B, o por los anticuerpos secretados por las células plasmáticas, da lugar a la producción del complejo Antígeno-Anticuerpo.

Virtualmente toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a este como un antígeno. La característica principal en un antígeno es su capacidad para ser reconocido por un determinado anticuerpo, conocida como antigenicidad.

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina “epítipo” o “determinante antigénico”. Un antígeno puede presentar un número variable de epítipos de estructura única o repetitiva (Reina, 2003).

Existen diferentes clases de antígenos (Wallace, 2006):

- **Inmunógeno:** capaz de inducir una respuesta inmune adaptativa efectora.

- **Tolerógeno:** genera un estado de tolerancia inmunológica (incapacidad de producir respuesta inmune efectora).

- **Autoantígeno:** antígeno propio capaz de inducir autoinmunidad.

- **Superantígeno:** inmunógeno que no interactúa a través del receptor para antígeno en linfocitos.

- **Mitógeno:** inductor de respuestas adaptativas por estimulación de la proliferación no específica de linfocitos.

- **Alérgeno:** inductor de alergia.

- **Hapteno:** sustancia antigénica no inmunogénica; adquiere esta propiedad al unirse a una proteína llamada transportadora.

4.2.8.4. Alérgenos.

Alérgeno es una palabra compuesta por “Alergia” y “-geno”. La palabra alergia proviene de un término griego que significa reactividad alterada; la creó en 1906 un médico austriaco llamado Von Pirquet especializado en el estudio de reacciones del organismo frente a diversas sustancias (Mario, 2001). Este médico formó la palabra a partir del adjetivo ἄλλος (*ál.los*) (en femenino αλλη (*ál.le*), que significa “otro” (en latín, *alius*, *a*, *um*), más el sustantivo ἔργον (*érgon*), trabajo, que en composición puede adoptar la forma -εργία (*-érgia*) (DRAE, 2001)

Un alérgeno es un antígeno que provoca la producción de IgE por parte del sistema inmune, e induce, tras unirse a esta inmunoglobulina, una reacción alérgica. Inicialmente el término alérgeno se refería a lo que hoy denominamos fuentes de alérgenos, es decir, los pólenes, ácaros, mohos, alimentos, etc. Hoy se sabe que cada una de esas fuentes tiene varios componentes o moléculas alergénicas, designados como alérgenos.

Los alérgenos son antígenos inmunógenos, en su mayoría de naturaleza proteica o polisacáridica, capaces de provocar una reacción alérgica de Tipo I, según la clasificación de Gell y Coombs, mediada por IgE. Sin embargo, todavía

no se ha podido dar respuesta al porqué algunas proteínas son alérgenos y otras no. A la capacidad del alérgeno de producir alergia se denomina alergenidad (Reina, 2003).

Un individuo es alérgico, y por lo tanto propenso a padecer enfermedades alérgicas, cuando presenta una predisposición genética a desarrollar respuestas de hipersensibilidad frente a alérgenos que son inocuos para individuos que carecen de esa predisposición genética (Reina, 2003).

En la tabla siguiente se hallan detallados los tipos de alérgenos más frecuentes según su procedencia:

Tabla 4. 11 Tipos de alérgenos más frecuentes
(García, 2003)

Tipos	Más Frecuentes
Ambientales	Pólenes, esporas, ácaros y otros
Alimentarios	Presentes en leche, huevos y otros
Venenos de insectos	Picadura de avispa
Fármacos y haptenos	Penicilinas
Otros	Metales, látex y otros

En la siguiente tabla se citan las enfermedades alérgicas más frecuentes

Tabla 4. 12 Enfermedades alérgicas más frecuentes
(García, 2003)

Tipos	Más Frecuentes
Anafilaxia	Reacción sistémica aguda
Rinitis alérgica	Estornudos y congestión nasal
Dermatitis atópica	Erupción cutánea eccematosa
Asma	Inflamación crónica de bronquios
Urticaria y Angioedema	Enfermedad cutánea

4.2.8.4.1. Nomenclatura de alérgenos

Su nomenclatura se ha unificado en base a las recomendaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud en 1994. De este modo los alérgenos se nombran con las tres primeras letras del género y la primera letra de la especie. El número arábigo que acompaña a las letras denota o el orden de identificación del alérgeno dado o bien su importancia en las enfermedades alérgicas, por ejemplo, los alérgenos de *Olea europaea* Ole e 1, Ole e 2,.... (WHO, 1994). Hasta 1994 los alérgenos se nombraban siguiendo la misma regla pero escribiendo la letra de la especie en itálica y el número en numeración romana; así, los alérgenos de *Olea europaea* sería Ole e I, Ole e II, etc (Soler-Escoda *et al*, 2005)

4.2.8.4.2. Alérgenos. Caracterización

Los alérgenos pueden ser divididos en dos grupos:

1. Los que se originan de forma natural y
2. Aquellos originados por medio de la contaminación química.

En el primer grupo, los más frecuentes son los alérgenos aerotransportados del polen de diferentes plantas, en esporas de hongos y en fragmentos de plantas y de hifas de micelio. Los alérgenos aerotransportados incluyen también bacterias, ácaros del polvo, epidermis de animales domésticos, alérgenos de algunos productos alimenticios y veneno de algunos insectos. Los alérgenos originados de forma natural son normalmente proteínas con pesos moleculares de más de 10 kDa. Aquellos alérgenos originados por contaminación medioambiental son normalmente compuestos químicos de bajo peso molecular y elementos del tipo de los heptanos, los cuales adquieren propiedades antigénicas solamente después de su unión con proteínas en el organismo; los más representativos son metales, drogas, aditivos de alimentos, látex y aldehídos. (Puc, 2003).

Los alérgenos de polen son proteínas o glicoproteínas cuyo peso molecular oscila entre 10 y 70 kDa. Muchos alérgenos de polen son resistentes a cambios de pH y a altas temperaturas, incluso superiores a 100° C (Negrini, 1992).

Además de en los granos de polen, los antígenos pueden también estar presentes en otras partes de la planta tales como raíces, hojas, semillas, frutos, tallos; esto ha sido demostrado en varios tipos vegetales como ambrosias, gramíneas o plátanos (Pehkonen *et al*, 1994), (Spieksma *et al*, 1995) y (Schäppi *et al*, 1997). Algunas sustancias excretadas por las plantas, tales como zumos y aceites volátiles, pueden producir también reacción alérgica. También pueden producir dicha reacción algunos bioaerosoles de origen vegetal provenientes de fluidos liberados durante el tratamiento de algunas plantas. Se ha demostrado que el aceite volátil de las flores de *Citrus aurantifolia* (árbol de lima) produce un alérgeno llamado farnezol y que el polen de artemisia contiene, aparte de proteínas, sesquiterpenos que, aerotransportados, pueden estimular la aparición de dermatitis de contacto (Pagán *et al*, 2004)

4.2.8.5. Aeroalérgenos

Los aeroalérgenos son partículas alergénicas transportadas por el aire, capaces de producir alergia respiratoria, cutánea o conjuntival. Las que con mayor frecuencia producen cuadros alérgicos a través de la inhalación son: los pólenes y esporas de hongos. La mayor parte de los alérgenos transportados por el aire suelen ser proteínas o sustancias unidas a proteínas (Guidos *et al*, 2005).

4.2.8.5.1. Aeroalérgenos. Características

Características físicas, químicas y moleculares

Todos los aeroalérgenos descritos hasta la fecha poseen características físicas y moleculares distintas, no siendo ninguna de ellas atribuibles de forma exclusiva a su naturaleza alergénica. Aún así, se pueden encontrar ciertas propiedades comunes. Son proteínas o glicoproteínas, capaces de provocar una

reacción alérgica de Tipo I, mediada por IgE, con un peso molecular comprendido entre 5 y 70 kDa. El límite inferior lo determina el mínimo grado de complejidad molecular necesario para que sea una molécula inmunogénica y el límite superior la capacidad para atravesar la membrana de las mucosas (Mygind *et al*, 1996). Además, han de ser proteínas muy solubles, y estables en los fluidos corporales. Así, vemos que la capacidad de un material biológico para inducir alergia guarda relación directa con su grado de accesibilidad al organismo. Por ello, los alérgenos más comúnmente asociados a enfermedades atópicas son los inhalados (aeroalérgenos) y los ingeridos (alérgenos alimentarios). Otras importantes fuentes biológicas de alérgenos actúan por inyección o por contacto, como son el veneno de insectos y el látex (Huecas, 2001)

El patrón alergénico de los extractos biológicos puede ser muy simple conteniendo un número pequeño de alérgenos como ocurre en los venenos de avispas, o bien muy complejo, encontrándose un elevado número de alérgenos, como por ejemplo en el polen de olivo, que se pueden clasificar como principales o secundarios en función de la frecuencia con la que son reconocidos por una población de pacientes alérgicos. Así, un alérgeno es principal cuando es reconocido por más del 50% de los pacientes (Villalba *et al*, 2004); en otro caso se califica de secundario. En cada fuente alergénica se pueden encontrar uno o más alérgenos principales.

Se ha demostrado, en el caso de alérgenos como Ole e 1, que después de ser sometidos a procesos de deglicosilación pierden su propiedad alergénica, deduciendo que, en estos casos, los azúcares presentes son parte esencial de los epítomos reconocidos por los anticuerpos IgE (Arroyo *et al*, 2003)

Estabilidad de los aeroalérgenos

Los principales aeroalérgenos son termoestables y mantienen su alergenidad después del calentamiento, mientras que otros son considerados incompletos por ser susceptibles a pH's bajos y a la acción de enzimas proteolíticas.

En experimentos realizados con algunos alérgenos ricos en puentes disulfuro intramoleculares se ha determinado la importancia de estos en la conservación de la alergenicidad. Ejemplos de esto se encuentran en los alérgenos Der f 1, Der f 2, Lep d 2 (alérgenos de ácaros del polvo casero) Sin a 1 (mostaza), Ole e 1 (olivo), la aglutinina del germen de trigo y la lactoglobulina, en donde al reducir dichos puentes o bien eliminarlos por mutagénesis dirigida, los alérgenos pierden su capacidad de unión a IgE (Pedraza, 2004).

Tamaño de los aeroalérgenos:

El tamaño del alérgeno es importante para que pueda ser aerotransportado. Los aeroalérgenos mejor conocidos varían en tamaño entre 1 y 60 μm . Los mecanismos protectores de la mucosa nasal y de las vías respiratorias, a través de los cilios que transportan las partículas a la orofaringe, siendo estas deglutidas y desnaturalizadas rápidamente en el estómago, eliminan la mayoría de las partículas más grandes, de tal manera que sólo aquéllas de 3 μm o menores son capaces de alcanzar los alvéolos pulmonares. Ello explica una mayor exposición a las mucosas nasal y conjuntival, y de las vías respiratorias superiores. (Guidos *et al*, 2005).

Capacidad de producir respuesta:

Un aeroalérgeno tendrá importancia clínica cuando reúna estas dos condiciones:

- Poseer grupos antigénicos específicos capaces de provocar respuestas de hipersensibilidad en el hombre.
- Encontrarse en concentración suficiente en el aire, de tal modo que el nivel de exposición sea adecuado para provocar una respuesta inmunológica

Existen muchas sustancias transportadas en el aire, tanto de origen vegetal y animal, como productos químicos, capaces de provocar síntomas

alérgicos en individuos humanos sensibilizados. La respuesta individual depende de múltiples factores, tanto inherentes al sujeto alérgico, como al propio alérgeno (Guidos, *et al*, 2005):

- estado del sistema inmune,
- dosis de alérgeno,
- frecuencia y ruta de penetración,
- características físico-químicas, etc

Demostración de la unión a la IgE

La demostración de la alergenidad de un producto biológico debe hacerse experimentalmente, demostrando la capacidad de la molécula (o la fuente de alérgeno) para inducir la respuesta IgE en las personas o animales, ya sea in vivo o in vitro. Habitualmente se asume esta capacidad de inducir dicha respuesta y se evalúa la capacidad de unión del alérgeno a la IgE del suero de pacientes alérgicos. Para el caso del extracto alérgico, esto se hace con pruebas cutáneas, RAST o cualquiera de las variantes de ELISA (Caraballo, 1999).

Importancia clínica y epidemiológica

El papel que juega un alérgeno como inductor de síntomas en la población, es decir, como productor de enfermedades alérgicas, muchas veces se sospecha por las historias clínicas acumuladas por los médicos, y usualmente se demuestra mediante dos enfoques; el más directo emplea pruebas de provocación, entre las cuales están la provocación bronquial, nasal, conjuntival oral, cutánea y la prueba de liberación de histamina por los basófilos. Una manera indirecta es hacer estudios epidemiológicos, investigando así una relación causa-efecto a nivel de población. Estos estudios han pasado de simples descripciones de prevalencia de reacción IgE contra alérgenos entre los pacientes, a investigaciones rigurosas sobre el impacto clínico de los alérgenos en pacientes y controles (Caraballo, 1999).

Purificación

Aislar un alérgeno de su fuente es un paso esencial para analizar sus propiedades físicas, químicas, inmunológicas y funcionales. Actualmente el procedimiento más utilizado es clonar el gen del alérgeno en un vector y hacer que la proteína recombinante sea producida por bacterias, levaduras u otras células eucariotas. Para esto se necesita construir bibliotecas o librerías de cDNA, en donde se almacenan los genes de las proteínas que la fuente de alérgenos utiliza. La identificación de los alérgenos entre esa gran cantidad de proteínas se hace aprovechando la IgE específica de los sueros de pacientes alérgicos. Otra opción para purificar alérgenos es separar los componentes del extracto natural, para lo cual se emplean variadas técnicas de cromatografía e inmunoquímica (Caraballo, 1999).

Secuencia de aminoácidos

De la secuencia de aminoácidos, se derivan muchas de las propiedades físico-químicas del alérgeno pero es especialmente importante su comparación con las restantes proteínas descritas, para determinar homologías con la secuencia de otros alérgenos, lo que a su vez, permite predecir aspectos relevantes como la reactividad cruzada y la función biológica (Caraballo, 1999).

4.2.8.6. Reactividad cruzada

Las proteínas de diferentes antígenos pueden mostrar ciertas analogías en la secuencia de aminoácidos determinando similitud inmunológica y reactividad cruzada. Las reacciones cruzadas se llevan a cabo entre el anticuerpo y el alérgeno de estructura similar a la de aquel que estimula la producción del mismo anticuerpo. Los alérgenos principales del polen de árboles de zonas templadas son estructural e inmunoquímicamente similares. En las especies del mismo género la repetibilidad de la secuencia de aminoácidos alcanza del 80 al 90%

Dos alérgenos presentan reactividad cruzada sólo si comparten características estructurales, que hacen que sean reconocidos por anticuerpos IgE

de sueros de pacientes contra alguna de estas dos proteínas. Todos los alérgenos que presentan reacción cruzada tienen un plegamiento similar, en la mayoría de los casos, con más del 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos, mientras que aquellos con plegamiento similar no necesariamente han de mostrar reactividad cruzada (Aalberse, 2000)

La mayor parte de los alérgenos de origen natural son de naturaleza polipeptídica. Pero muchas proteínas alergénicas poseen además grupos químicos de diferente naturaleza, siendo los más frecuentes los carbohidratos. Así, tanto las proteínas como los glicanos constituyen los mejores candidatos para ejercer un papel en la reactividad cruzada entre diversas fuentes alergénicas naturales (Rodríguez *et al*, 1997).

En general, idénticas funciones son desempeñadas en organismos distintos por la misma proteína, sin embargo, la estructura de esta proteína puede diferir de unas especies biológicas a otras en un grado muy diverso, constituyendo una familia de proteínas homólogas. La similitud entre ellas viene regida por la proximidad filogenética de las especies comparadas. Tanta más parecidas serán las secuencias de aminoácidos de las proteínas con idéntica función cuanto más cercanas se encuentren las especies en el árbol evolutivo. Así, si la reactividad cruzada depende de la similitud de estructuras, tanto mayor probabilidad de ofrecer tales reacciones presentarán las proteínas alergénicas procedentes de fuentes biológicas distintas cuanto más relacionadas filogenéticamente se encuentren estas (Rodríguez *et al*, 1997).

A las proteínas con un alto nivel de similitud estructural o funcional, que se encuentran en diferentes fuentes alergénicas y que son responsables de fenómenos de reactividad cruzada, se les denomina *panalérgenos*.

Además de las proteínas, los azúcares pueden también encontrarse implicados en reacciones cruzadas, pero ello se debe a la confluencia de estructuras, es decir, a la restringida diversidad de sus estructuras alergénicas (Rodríguez *et al*, 1997).

Según R. Rodríguez y M. Villalba, 1997, los factores que condicionan la existencia de reactividad cruzada son los siguientes:

- Una estructura molecular altamente conservada.
- Coincidencia de tejido: La reactividad cruzada será tanto más probable e intensa cuanto más relacionados se encuentren los tejidos alergénicos
- Proximidad filogenética de las especies alergénicas

En la práctica, la reactividad cruzada, al margen del caso de algunos insectos, peces y ácaros, posee fundamentalmente dos frentes de estudio: la que tiene lugar entre los pólenes, y la que se da entre pólenes y algunos alimentos de origen vegetal como las frutas y las hortalizas

El principio básico es el siguiente: *“si una molécula B es capaz de inhibir la unión de la IgE específica contra la molécula A, es porque comparte sitios de unión de IgE con la molécula A”*.

Mediante experimentos de ELISA competitiva e inmunoblots, utilizando alérgenos de diferentes especies de plantas no relacionadas que contienen dominios EF-hand de unión a Ca^{2+} , se estableció que sólo aquellos que contaban con el mismo número de dominios, presentaban una inhibición del 100%, estableciendo la mayor reactividad cruzada. En otro estudio se comparó a dos alérgenos de la misma especie que unen calcio, Ole e 3 y Ole e 8 (del olivo), observando que cada uno presenta epítomos específicos de unión a IgE, por lo que los dominios estructurales EF-hands de estos alérgenos no son los epítomos responsables de la reactividad cruzada, indicando que estos se encuentran en sitios menos conservados. Finalmente, la reactividad cruzada entre algunos alérgenos glicosilados de diferentes especies de plantas, depende en cierto grado de los carbohidratos presentes en la superficie de estas proteínas, denominados carbohidratos determinantes de la reactividad cruzada (CCD), aunque por sí solos estos son clínicamente irrelevantes y con baja afinidad para un entrecruzamiento efectivo. (Caraballo, 1999)

4.2.8.7. Identificación de epitopos

Con el fin de analizar en detalle la respuesta inmunológica contra los alérgenos, es muy conveniente estudiar los componentes inmunogénicos de estos, ya sea a nivel celular (epitopos T) o humoral (epitopos B). Simplificando, puede decirse que los epitopos son las unidades mínimas reconocidas por los anticuerpos o los receptores de los linfocitos T. Generalmente, para identificar y localizar epitopos es necesario conocer la secuencia de aminoácidos, a partir de la cual se sintetizan pequeños péptidos que, superponiéndose parcialmente en sus extremos, equivalen a toda la secuencia del alérgeno. (Caraballo, 1999)

4.2.8.8. Características intrínsecas de los alérgenos y su relación con la alergenidad

Modificaciones postraduccionales

La mayoría de los alérgenos son proteínas extracelulares, que suelen sufrir modificaciones postraduccionales, siendo la principal la glicosilación. Las glicoproteínas se forman en el retículo endoplásmico, donde se unen de manera covalente oligosacáridos a los residuos de asparaginas (N-glicanos), de serinas/treoninas (O-glicanos) o bien de prolina y lisinas en las proteínas de plantas.

Estas reacciones se llevan a cabo gracias a la acción de glicosiltransferasas y de algunas glicosidasas. Las glicoproteínas presentan cambios en la estabilidad, la solubilidad, la hidrofobicidad y en la carga eléctrica, ocasionando que los sitios glicosilados sean más visibles al sistema inmune del huésped. Algunos alérgenos N-glicosilados de plantas, altamente inmunogénicos, presentan azúcares como manosa, fucosa, xilosa y N-acetilglucosamina, en un orden que no se encuentra en los glicanos de mamíferos, estableciendo que este orden es precisamente la clave de la alergenidad. Se ha podido demostrar para el caso de alérgenos de olivo como Ole e 1 y de heno como Phl p 1, que después de ser sometidos a procesos de desglicosilación, tales como la oxidación con periodato o ácido trifluorometanosulfónico (TFMS), ambas proteínas perdieron

sus propiedades alergénicas, por lo que se pudo deducir que, en estos casos, los azúcares presentes son parte esencial de los epítomos reconocidos por los anticuerpos IgE (Pedraza, 2004)

Similitud con proteínas endógenas

Los alérgenos más potentes son aquellos que presentan las mayores diferencias a las proteínas endógenas del hospedador, puesto que aquéllas que presentan gran similitud molecular están implicadas en mecanismos de tolerancia (Pedraza, 2004)

Actividad enzimática

Existen alérgenos con capacidad enzimática, en su mayoría actividad proteásica y nucleásica, por ejemplo Der p 1, el cual tiene actividad cistein-proteasa que ayuda a incrementar su permeabilidad en el epitelio bronquial, facilitando así su procesamiento (Pomes, 2002).

Alérgenos ligantes y transportadores de Calcio

Algunos alérgenos encontrados en plantas y animales unen y transportan Ca^{2+} . Estos presentan de 2 a 8 dominios llamados plegamientos tipo calmodulina, que interactúan con diferentes ligandos dependientes de Calcio. Dentro de esta categoría se encuentran Ole e 3 y Ole e 8. Se piensa que un alérgeno puede asumir de manera reversible diferentes conformaciones, exponiendo epítomos variables que ocasionan interacciones diferentes con IgE de suero de pacientes (Pedraza, 2004).

Además también podemos encontrar alérgenos transportadores como las lipocalinas (proteínas altamente solubles que transportan retinol, esteroides, lípidos y feromonas), alérgenos que unen actina como las profilinas o alérgenos que interactúan con carbohidratos como aquéllos del látex (Pedraza, 2004).

Alérgenos que unen actina

Las profilinas son proteínas ubicuas de células eucarióticas, fijadoras de monómeros de actina, aunque también interactúan con cadenas de poli L-prolina y con algunos fosfolípidos, de modo que están involucradas en la modulación y ensamblaje de los microfilamentos de actina en el citoplasma, en los procesos de motilidad celular. Su nombre se debe a que forman complejos “profilamentosos” con la actina. Se ha encontrado que las áreas superficiales que contienen los epítomos de unión a IgE de este tipo de alérgenos, son las mismas que interactúan con actina, indicando que las áreas expuestas a la superficie, que muestran afinidad por ligandos naturales, son también reconocidas por las regiones variables de estos anticuerpos.

Según los trabajos de Martínez A. y Asturias, J.A. en 2000, su papel como alérgeno fue puesto de manifiesto como consecuencia de investigaciones llevadas a cabo en el polen de Abedul (*Betula verrucosa*), aunque rápidamente se observó su presencia en otros pólenes de plantas taxonómicamente distantes y en alimentos de origen vegetal, demostrándose su responsabilidad en fenómenos de reactividad cruzada, acuñándose por primera vez el término “panalérgeno” (Martínez *et al*, 2000)

Lectinas

Conocida anteriormente como aglutinina vegetal, las lectinas son una clase de proteínas que se ligan a secuencias específicas de determinados carbohidratos presentes en las glicoproteínas. Se encuentran especialmente en las legumbres. Algunas reaccionan de manera no específica con los carbohidratos presentes en la molécula de IgE provocando liberación de histamina y consecuentemente sintomatología alérgica (Rossi *et al*).

4.2.8.9. Estructura de los alérgenos

En los últimos años se han resuelto varias estructuras cristalográficas de alérgenos, las cuales han servido para los primeros análisis comparativos entre

ellos. En 1998, Rouvinen y colaboradores realizan un análisis de las primeras ocho estructuras de alérgenos que aparecieron en el PDB (Protein Data Bank), estableciendo que estas tienen en común ser esféricas y elípticas (Rouvinen *et al*, 1999). En el año 2000, Aalberse y colaboradores realizan una clasificación de alérgenos en base a los plegamientos de estructura secundaria predominantes en cuarenta de estos, proponiendo una subdivisión en cuatro familias estructurales definidas que se dan en la tabla siguiente (Aalberse, 2000. Modificada por Rossi *et al*,)

Tabla 4. 13 Estructura de alérgenos. Clasificación según plegamiento.
(Aalberse *et al*, 2000)

<p>Tipo 1 Hojas β antiparalelas</p>	<p>Familia de las Inmunoglobulinas Grupo 1,2, 3 y 11 de las Poaceae Grupo 2, 3, 6 y 9 de los ácaros Serín-proteasa Ole e 1</p>
<p>Tipo 2 Hojas β antiparalelas íntimamente asociadas a una o más hélices α</p>	<p>Grupo 1 de los árboles Lipocalina B-lactoglobulina Can f 1, Can f 2 Bos d 1 Equ c 1 Profilinas Bla g 2</p>
<p>Tipo 3 Hojas β y hélices α poco asociadas</p>	<p>Grupo 1 de los ácaros Lisozima-Lactoalbúmina Grupo 5 de los vegetales Grupo 4 de las Poaceae Grupo 7 de los árboles Fosfolipasa A2</p>
<p>Tipo 4 α-hélice</p>	<p>Proteína de transferencia lipídica inespecífica Hemoglobina de insectos Calmodulina Bet v 4 Phl p 7 Albúmina sérica</p>
<p>Tipo 5 Otras estructuras</p>	<p>Amb e 1, Amb e 2 Cry j 1 Ovoalbúmina Amb e 5, etc...</p>

4.2.8.10. Utilidad diagnóstica

La utilidad diagnóstica de un extracto alérgico, ya sea de polen, ácaro, alimento, epitelio de gato, etc, se calcula por la correlación positiva entre las pruebas cutáneas o el RAST con dicho extracto y la sintomatología clínica. Los alérgenos mayores son los que inducen la producción de IgE específica en más del 50% de los pacientes y son responsables de más del 10% de la actividad alérgica del extracto total. Un alérgeno contra el cual reaccione el 90% de los pacientes sería un buen candidato para reemplazar el extracto total. Por lo anterior, actualmente se evalúa la prevalencia de positividad contra cada uno de los alérgenos purificados, en la perspectiva de que sirvan como reactivos diagnósticos, tanto para pruebas cutáneas como para pruebas in vitro (Caraballo, 1999).

4.2.8.11. Potencial terapéutico

Desde el punto de vista médico, el objetivo principal de la caracterización de los alérgenos es su aplicación para el control de las enfermedades alérgicas.

Durante el presente siglo la inmunoterapia con extractos alérgicos se ha mantenido como la única opción terapéutica capaz de modificar el curso de las enfermedades alérgicas, especialmente la anafilaxia por picaduras de insectos y los problemas respiratorios provocados por aeroalérgenos. Sin embargo, este tratamiento se podría mejorar en cuanto a riesgos y eficacia. Como consecuencia de los avances logrados en la caracterización de los alérgenos, para el próximo siglo se proyectan alternativas terapéuticas novedosas. Estas van desde su modificación química o genética para disminuir la reactividad IgE hasta su administración conjunta con secuencias de nucleótidos inmunoestimuladoras de la respuesta Th1. También se contempla la posibilidad de profilaxis con vacunación temprana de la población genéticamente susceptible. Es evidente que todavía se requiere más información en este aspecto, tanto identificar las características de aquellos antígenos que son capaces de inducir una respuesta inmune sin llegar a ser alérgicos, como establecer los mecanismos inespecíficos de los alérgenos

para el desarrollo de la alergia. El conocimiento de las áreas y los residuos de alérgenos involucrados en la interacción con los anticuerpos IgE, así como el tipo de interacciones presentes, permitirán llevar a cabo el diseño de inmunoterapias específicas. Estas podrán utilizar proteínas recombinantes y derivados hipoalergénicos, que presenten el plegamiento original con modificaciones en dichos residuos, lo que permitirá evitar el desarrollo de las reacciones alérgicas, logrando en un futuro cercano la vacunación profiláctica en contra de la alergia (Caraballo, 1999).

4.2.8.12. Alérgenos polínicos

Los granos de polen como alérgenos

Polinosis es el desorden alérgico más común. Como es bien conocido, las manifestaciones clínicas de polinosis son determinadas por una hipersensibilidad específica para polen, especialmente los pólenes anemófilos de ciertas plantas, entre personas físicas genéticamente susceptibles.

Hay que recordar los postulados dados por Thommen en 1931 para que un polen pueda sensibilizar a un individuo atópico y así causar síntomas clínicos:

1. Debe contener un componente antigénico inductor de sensibilidad.
2. Debe formar parte de una planta anemófila.
3. Debe producirse en las cantidades grandes.
4. Debe ser lo suficientemente ligero para recorrer largas distancias.
5. Debe formar parte de una planta que crece ampliamente.

El polen debe contener un componente específico que cause sensibilización (el antígeno) y que pueda específicamente inducir una respuesta IgE-mediada (el alérgeno) provocando síntomas clínicos. Esto puede explicar la incidencia relativamente baja de polinosis causada por especies anemófilas como Pinaceae, *Castanea*, *Fagus* o *Quercus*, aunque muy abundantes en algunas

localidades no producen una sensibilización alérgica, consecuencia de la baja alergenidad de sus pólenes (Spieksma, 1990).

Aunque los pólenes constituyen la fuente clásica de alérgenos, varios estudios han revelado la presencia de antígenos en raíces, tallo y las hojas de algunas plantas. Estudios recientes de cuantificación inmunocitoquímica de aeroalérgenos y niveles de polen concluyen que existe buena correlación entre ambos, aunque frecuentemente con un rango de valores más ancho para los alérgenos aerotransportados. Esto indica que los alérgenos proceden no sólo del grano de polen sino que también de otras partes de la planta.

Composición química del grano de polen:

El conocimiento de los componentes del grano de polen puede ser determinante para la comprensión de las enfermedades alérgicas. El contenido del polen varía de especie a especie pero en general podemos decir que está formado de:

- Proteínas (cerca de 20%), entre ellos los ocho aminoácidos indispensables para la vida: isoleucina - leucina - lisina - metionina - fenilalanina- treonina - triptófano – valina, Ácidos aspártico y glutámico y alanina, arginina, cistina, glicina, histidina, prolina, serina y tirosina.
- Glúcidos en formas de diversos azúcares, (la proporción varía entre 35% y 40%).
- Lípidos (en promedio cerca del 5%)
- Sustancias minerales y oligoelementos (cerca del 3%), especialmente calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre, manganeso, etc.
- Muchas vitaminas, todas las del grupo B, la provitamina A y las vitaminas C, D, y E.
- Enzimas, que actúan como catalizadores en el metabolismo: amilasa, invertasa y fosfatasas.

Los pólenes, para que sean considerados como causantes de alergias, deben reunir una serie de características: ser pequeños, producirse y liberarse en

cantidad suficiente para alcanzar grandes concentraciones en el aire y proceder de una planta que tiene una amplia difusión local (Guidos *et al*, 2005).

Localización celular de los alérgenos polínicos

Los alérgenos polínicos son proteínas, glucoproteínas o lipoproteínas de bajo peso molecular, intracelulares, que se difunden a través de la pared del polen cuando está en contacto con un medio húmedo o acuoso (Knox *et al*, 1996) (Casas *et al*, 1996).

Se han localizado también alérgenos en zonas extracelulares, como Cavidades de la exina, intina y orbículos de Ubisch (Miki, 1994).

Durante el desarrollo, activación y germinación de los granos de polen, tiene lugar la expresión de diferentes proteínas y glucoproteínas difusibles, relacionadas con el reconocimiento polen-estigma. Muchas de ellas son las responsables de la sensibilización alérgica.

El polen contiene genes de expresión esporofítica, originados por las células del tapete y genes de expresión gametofítica originados por las células vegetativa y generativa. El conocimiento de los mecanismos de transferencia de proteínas durante el desarrollo del polen será cada vez más necesario para controlar el enorme abanico de proteínas del polen o de fracciones de la antera que son susceptibles de dispersarse en la atmósfera.

Encontrar patrones de marcaje de diferentes epítomos de proteínas alergénicas, durante el desarrollo, activación y germinación de los granos de polen, permitirá profundizar en el conocimiento de los mecanismos de liberación de las proteínas difusibles y su incidencia en los procesos de sensibilización, así como en las reacciones cruzadas.

Origen y función de los alérgenos polínicos

Durante el desarrollo de los granos de polen se establece un patrón de organización de la pared polínica, esporodermis, básicamente relacionado con la posición de las aperturas y estratificación y ornamentación de las dos capas principales: la *exina*, o capa más externa, formada a su vez por dos subcapas, ectexina y endexina y la *intina* o capa mas interna. La diversidad y complejidad de la pared polínica está directamente relacionada con las numerosas funciones que esta tiene que llevar a cabo: proporciona protección física al contenido citoplasmático, determina las rutas de transferencia de agua y participa en el transporte de proteínas y enzimas involucradas en la interacción entre el polen y la superficie estigmática. Por otra parte, presenta una estructura muy elaborada, con un diseño específico, determinado genéticamente, que aporta caracteres taxonómicos de gran utilidad en el reconocimiento de los distintos tipos de polen.

Las células del tapete pasan por diferentes ciclos de actividad secretora y de degradación. Su papel en el desarrollo de las microsporas incluye la producción y liberación de proteínas, la formación de precursores de la pared (esporopolenina), y el depósito de sustancias lipídicas que al final del desarrollo recubren exteriormente la pared de los granos de polen, como la trifina y el *pollenkitt*. El *pollenkitt* está formado por ceras, lípidos, pequeñas moléculas aromáticas y proteínas. Se acumula en plastidios que en la madurez se degradan y dejan en libertad masas o gotas de *pollenkitt* que recubren los granos de polen maduros. Es muy denso y abundante en granos de polen entomófilos y menos en los anemófilos.

Al *pollenkitt* se le atribuyen diversas funciones:

- Éxito en la dispersión de los granos de polen.
- Modulación del intercambio de agua entre los granos de polen y el ambiente.
- Protección frente a las radiaciones solares y la falta de agua.

- Determinación del color del polen.
- Atracción de polinizadores.
- Mantenimiento de las proteínas esporofíticas en las cavidades de la exina.

En este último caso, el *pollenkitt* favorece la dispersión de proteínas esporofíticas de la antera que se transportan situadas en el exterior del polen, por lo que podrían inducir la respuesta alérgica a proteínas.

Los tapetes secretores producen además los orbículos tapetales (cuerpos u orbículos de Ubisch). Son partículas de esporopolenina, resistentes a la acetólisis y reaccionan de forma similar que la exina a diferentes tinciones histoquímicas, evidenciando que su componente mayoritario es esporopolenina. Presentan un corazón o parte interna formado por lípidos, polisacáridos y proteínas; estas últimas que en algunos casos, como por ejemplo cupresáceas y gramíneas, se ha visto que son proteínas alergénicas. Son pauci-partículas y su presencia en la atmósfera libres o unidas a los granos de polen constituyen un elemento más en el transporte y difusión de los alérgenos en la atmósfera (Suárez-Cervera *et al*, 2005).

Solubilidad y alergenidad

Durante la dehiscencia de las anteras, los granos de polen sufren una deshidratación rápida que reduce el volumen del polen un 35%. Cuando llegan a un estigma receptor o a un medio húmedo, como puede ser la mucosa de las personas sensibles, experimentan una hidratación considerable. Una vez hidratados los granos de polen, transfieren proteínas y enzimas al medio. Estas proteínas del polen serán las que intervengan en el proceso germinativo, pero también en la respuesta alérgica de las personas sensibles. Los alérgenos polínicos son rápidamente liberados al ponerse en contacto con la mucosa nasal u ocular y pueden inducir la aparición de polinosis en pacientes sensibilizados. Existe pues una relación directa entre la solubilidad y la alergenidad de los alérgenos

polínicos. Con técnicas de inmunocitoquímica y, gracias a la alta resolución del microscopio electrónico, se localizaron en distintos compartimentos celulares los alérgenos Bet v 1, Bet v 2 y Lol p 1, así como diversos alérgenos de *Parietaria judaica* y diferentes gramíneas comprobándose que, en contacto con un medio húmedo, difunden rápidamente al exterior (Suárez-Cervera *et al*, 2005).

Actividad enzimática asociada con los alérgenos polínicos

El proceso de hidratación del grano de polen, que de manera natural tiene lugar en la superficie del estigma, está especialmente diseñado para alcanzar el éxito en los primeros momentos de la germinación. Para ello la mayor parte de las proteínas que actúan en este proceso tienen actividad enzimática. Se han descrito alérgenos que presentan actividad ribonucleasa (Buñe *et al*, 1996), son inhibidores de la tripsina o están relacionados con el transporte de proteínas.

También se han purificado profilinas en pólenes de diferentes familias de plantas. Recientemente se ha clonado un alérgeno mayoritario en el polen de *Cupressus arizonica*, Cup a 3, que es una proteína relacionada con la defensa frente a patógenos, PR-5, que se expresa solamente en pólenes de zonas polucionadas (Cortegano *et al*, 2003). La expresión de esta proteína en respuesta al estrés de la contaminación, se iniciará probablemente durante el desarrollo del grano de polen (Suárez-Cervera *et al*, 2005).

Algunos de estos alérgenos polínicos, de gran incidencia en los problemas de polinosis, presentan actividad enzimática relacionada con el inicio del crecimiento del tubo polínico. Entre ellos destacamos la actividad pectato-liase y poligalacturonasa, inhibidora de la invertasa y proteínas transportadoras de lípidos (Suárez-Cervera *et al*, 2005).

Identificación de los alérgenos polínicos

Mediante técnicas adecuadas se pueden identificar los componentes del polen que causan alergia, definir su actividad, purificarlos y estandarizarlos con fines diagnósticos y terapéuticos

Según el grado de respuesta de las personas sensibles al alérgeno estos se clasifican en:

- * Alérgenos principales: aquellos que provocan reacción en la mayoría de los pacientes, mayor del 90% en la prueba del pinchazo o prick Test, o mayor del 50% mediante la técnica CRIE o cuantificación de la Ig E específica

- * Alérgenos menores: aquellos que, sin embargo tienen un efecto importante sólo en un número pequeño de pacientes (10% o menos) o un efecto bajo en un número grande de pacientes.

La identificación, el aislamiento y la purificación de alérgenos de polen comienzan con la extracción y la solubilización del polen de las flores recolectadas. El extracto acuoso luego experimenta análisis diversos según la meta de la investigación.

Para conocer la composición química, se determinan las proteínas, el contenido total de nitrógeno y el nitrógeno proteico, además del análisis de la estructura de aminoácidos, glúcidos, lípidos, etc.

Por lo que respecta a las propiedades físicas (el peso molecular, la carga eléctrica, y el punto isoelectrico) se aplican métodos como la ultracentrifugación analítica, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), electroforesis en gel del poliacrilamida (SDS-PAGE), electroforesis y enfoque isoelectrico (IEF). Para la caracterización del antígeno se usan técnicas inmunológicas de inmunoprecipitación immunoelectrophoresis y cross-immunoelectrophoresis. Recientemente las técnicas immunoquímicas han sido respaldadas por las técnicas genéticas que identifican las secuencias de los aminoácidos.

4.2.8.13. Fracciones alérgicas del polen de olivo

Prácticamente todos los trabajos coinciden a la hora de señalar la compleja mezcla de proteínas alérgicas que contiene un extracto de polen de olivo. Hasta la fecha se han identificado, aislado y caracterizado sólo diez de las

más de veinte bandas detectadas en los análisis bioquímicos de extractos de polen de olivo, destacando entre sus alérgenos Ole e 1, proteína glicosilada que se comporta como epítipo alérgénico en aproximadamente el 62% de los pacientes (Villalba *et al*, 1993) (Batanero *et al*, 1999). La profilina del olivo (Ole e 2) se detecta en el 24% de los casos y tiene identidad con la profilina de abedul (Ledesma *et al*, 1998b). El alérgeno Ole e 3 corresponde al grupo de proteínas que unen Calcio (procalcinas), y su capacidad de fijación de IgE alcanza hasta el 50% en áreas con alta densidad de olivares (Ledesma *et al*, 1998b). Otro alérgeno de elevada capacidad de unión IgE es el Ole e 4 (80%), de 32 kDa, y sin homología con otras proteínas conocidas. Más limitada es la fijación IgE de Ole e 5 (35%), que presenta una alta homología con la superóxido dismutasa de varias plantas (espinaca, maíz, tomate) (Boluda, 1998). Muy variable es la detección de Ole e 6 en pacientes alérgicos a polen de olivo, oscilando entre el 10 y el 55%, y siendo más frecuente en zonas muy olivareras, como es la provincia de Jaén (Batanero, 1997). Igualmente variable es la fijación IgE de Ole e 7, que presenta homología con las proteínas transportadoras de lípidos (Tejera *et al*, 1999). Otro alérgeno de la familia de los ligantes del Calcio es Ole e 8, que además se detecta en el alérgeno mayoritario de *Juníperus oxicedrus* (Jun o 2), por lo que podría contribuir a la presencia de reactividad cruzada entre ambos taxones polínicos. Ole e 9, una β -1-3-glucanasa de 45 kDa, que alcanza el 65% de fijación IgE en las personas alérgicas a polen de olivo, y que también podría estar implicada en la reactividad cruzada con otros alérgenos vegetales (látex, plátano,...) (Rodríguez *et al*, 2002). Ole e 10 define una nueva familia de proteínas con capacidad de unión a carbohidratos, potencialmente implicada en la germinación del polen; su peso molecular es de 10 kDa y se ha descrito como principal inductor de la alergia tipo I en los humanos; se ha demostrado que se une también a 1,3- β -glucanos preferentemente (Barral *et al*, 2005a)

Prácticamente todos los trabajos coinciden a la hora de señalar la compleja mezcla de proteínas alérgicas que contiene un extracto de polen de olivo. Según los trabajos de Wheeler de 1990, los primeros estudios realizados con el fin de caracterizar los alérgenos del polen de olivo describen el reconocimiento de bandas proteicas con pesos moleculares de 65, 42, 32, 19 y 17

kDa, destacando entre sus alérgenos Ole e 1, proteína glicosilada que se comporta como epítipo alérgico en aproximadamente el 62% de los pacientes (Villalba *et al*, 1993) (Batanero *et al*, 1999). Hasta la fecha se han identificado, aislado y caracterizado sólo once de las más de veinte bandas detectadas en los análisis bioquímicos de extractos de polen de olivo, desde Ole e 1 a Ole e 11, siendo la última Ole e 11 (Lahoz *et al*, 2007).

4.2.8.13.1. Ole e 1

Ole e 1 está considerado como el alérgeno principal del polen de olivo. Este alérgeno constituye más del 10% del contenido total de proteínas del polen en las variedades de árboles de *Olea europaea*, pero no existe en frutos (lo cual, según Villalba *et al*, 1993, explica la ausencia de hipersensibilidad de los pacientes alérgicos al polen de olivo cuando ingieren aceitunas o aceite de oliva), hojas ni ramas, de tal modo que estos tejidos no son capaces de inducir alergia (Rodríguez, 2007). La prevalencia alérgica de Ole e 1 varía según las diferentes zonas geográficas estudiadas y alcanza valores desde el 10% hasta un 55% en áreas donde el olivo se cultiva extensamente como es la provincia de Jaén en donde junto con Ole e 1 es un alérgeno clínicamente importante por ser causa de alergias respiratorias (Batanero, 1997).

Se ha purificado a partir del extracto de polen de olivo (Lombardero *et al*, 1992) y se ha determinado su secuencia de aminoácidos mediante la degradación de Edman de los péptidos resultantes de digestiones proteolíticas (Villalba *et al*, 1993). La proteína, altamente polimórfica, con pI entre 5.0 y 7.2, según Villalba *et al*, en 1994, contiene 145 aminoácidos con una masa molecular de 16.331 Da (determinada por espectrometría de masas). Contiene un grupo glicosídico unido covalentemente a la Asn-111 (De Cesare *et al*, 1993) (Batanero *et al*, 1994). Debido a este carácter glicoproteico presenta en PAGE-SDS un patrón complejo formado por dos bandas mayoritarias de 18,5 y 20 kDa, esta última glicosilada (Florido *et al*, 2003), y dos componentes minoritarios de 22 y 40 kDa que corresponden a una molécula con un mayor contenido en azúcares y a la forma dimérica respectivamente. Ole e 1 contiene 6 residuos de cisteína en

posiciones 19, 22, 43, 78, 90 y 131, formando tres puentes disulfuro (González *et al*, 2000). Mediante la degradación de Edman se encontraron dos de estos puentes disulfuro formados entre los aminoácidos Cys19-Cys90, Cys22-Cys131. Mediante proteólisis específica con termolisina con separación por HPLC de fase inversa se encontró un tercer puente disulfuro en Cys43-Cys78 (González *et al*, 2000).

Ole e 1 presenta homologías y reactividad cruzada con pólenes de Oleaceae y con pólenes de no Oleaceae. Entre las Oleaceae, las proteínas homologas son de pólenes de *Ligustrum*, *Fraxinus* y *Syringa*, cuyos alérgenos respectivos son Fra e 1, Lig v 1 y Syr v 1. Entre las no Oleaceae, los alérgenos homólogos conocidos son de *Plantago lanceolata* (Pla ℓ 1), de *Chenopodium album* (Che a 1), de *Lolium perenne* (Lol p 11) y de *Phleum pratense* (Phl p 11). Entre los homólogos no alergénicos se encuentra BB18 de *Betula verrucosa* (Rodríguez *et al*, 2007)

El oligosacárido de Ole e 1 se ha aislado y purificado, lo que ha puesto de manifiesto la existencia de distintas glicoformas complejas y ricas en manosas. Asimismo, se ha demostrado que presenta actividad antigénica y alergénica, siendo capaz de provocar la liberación de histamina en los pacientes alérgicos (Batanero *et al*, 1999). También se demostró que dicho oligosacárido es responsable de la reactividad cruzada de Ole e 1 con proteínas de fuentes biológicas no relacionadas con el olivo (Batanero *et al*, 1996). Mediante los trabajos de Van Ree y colaboradores se ha resuelto la estructura de los componentes mayoritarios de este azúcar mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (Van Ree *et al*, 2000)

La mayoría de las moléculas de Ole e 1 contienen un glicano, unido por su extremo N-terminal, que puede ser fácilmente liberado con la endoglicosidasa PNGasa F (Batanero *et al*, 1999), y resultados similares se obtuvieron con los glicanos de Ole e 1 homólogos en otras Oleaceae. El N-glicano de Ole e 1 se une a anticuerpos específicos IgE de suero humano e induce la liberación de histamina de basófilos de pacientes sensibilizados (Batanero *et al*, 1999)

A partir del RNA total aislado del polen de olivo se amplificó el cDNA codificante de Ole e 1, se clonó y secuenció, revelando una considerable heterogeneidad para el alérgeno Ole e 1 que podría comprender una familia de proteínas, incluyendo al menos nueve miembros, lo cual se añade a la observación de múltiples moléculas de mRNA derivadas del cDNA (Villalba *et al*, 1994) (Lombardero *et al*, 1994)

La función biológica de Ole e 1 es desconocida. No presenta similitud con otras proteínas alergénicas, aunque su secuencia tiene un 36% de identidad con la de otras proteínas de las anteras del tomate y del polen del maíz, que se han involucrado en el crecimiento del tubo polínico; por esta razón, este alérgeno puede estar involucrado en funciones reproductivas (Florido *et al*, 2003)

4.2.8.13.2. Ole e 2

El grano de polen genera mediante una rápida elongación celular un tubo polínico con un ápice en crecimiento polarizado, que requiere una constante remodelación del citoesqueleto de actina. Las profilinas son proteínas solubles de bajo peso molecular (12-18 kDa), ubicuas en animales, plantas e incluso virus, implicadas en la modulación de esta dinámica. Para controlar dicha modulación, estas proteínas se unen a actina monomérica formando el complejo denominado profilactina, que debe desagregarse para permitir la polimerización de filamentos de actina durante la germinación. Las profilinas también interactúan con otros ligandos, tales como polifosfoinosítidos asociados a membrana, influyendo en la señalización celular (Goldschmidt-Clermont *et al*, 1990)

Ole e 2 presenta una masa molecular aparente de 15 kDa. La profilina del olivo (Ole e 2) tiene identidad con la profilina de abedul y los pacientes con alergia al polen del olivo exhiben IgE específica frente a ella en el 24% de los casos (Ledesma *et al*, 1998b), aunque este porcentaje de sensibilización es posible que pueda fluctuar de forma importante dependiendo de la existencia de otros síndromes asociados a la polinosis, como es la alergia a las frutas (Florido *et al*, 2003). Su ubicuidad, unida a su secuencia altamente conservada hace que hayan

sido consideradas panalérgenos causantes de reactividad cruzada (Valenta *et al*, 1992)

Ole e 2 presenta una prevalencia en inmunotransferencia del 24%, pero cerca del 50% de los sueros pierden reactividad debido al SDS, luego la prevalencia real debe ser notablemente superior al 50% de los pacientes alérgicos al polen de olivo. Se ha detectado reactividad cruzada de Ole e 2 con algunas gramíneas, betuláceas y otros miembros de la familia de las oleáceas (Ledesma *et al*, 1998b)

Mediante técnicas inmunocitoquímicas con microscopía confocal y utilizando un anticuerpo primario policlonal anti-Ole e 2 se detectó la localización de Ole e 2 principalmente en los laterales de la apertura de los granos de polen, a través de la cual emerge el tubo polínico. La alta solubilidad de las profilinas las hace fácilmente accesibles al sistema inmune y las caracteriza como potentes alérgenos. La solubilización del alérgeno debe indicar una disociación del complejo profilina-actina al final de la primera etapa de germinación de polen, lo cual podría favorecer la formación del citoesqueleto y crecimiento del tubo polínico (Morales *et al*, 2006)

Según los trabajos de 2006 de Morales y colaboradores, se han detectado al menos 3 isoformas de profilina distribuidas de forma diferencial en los cultivares estudiados; esto puede afectar a los perfiles teóricos de hidrofiliidad y antigenicidad.

4.2.8.13.3. Ole e 3

El Ole e 3 corresponde al grupo de proteínas que unen Calcio (polcalcinas), y su capacidad de fijación de IgE alcanza hasta el 50% en áreas con alta densidad de olivares. Presenta reactividad cruzada con algunas estructuras proteicas de la familia de las polcalcinas de otras oleáceas, las gramíneas, el pino y el ciprés (Ledesma *et al*, 1998a). Es una pequeña proteína, de 9,2 kDa y ácida (con un pI 4,2-4,3) que ha sido purificada a partir del polen donde se expresa de manera exclusiva (Batanero *et al*, 1996). No contiene aminoácidos aromáticos

(Trp o Tyr), lo cual ha impedido la realización de algunos estudios espectroscópicos. Tampoco contiene cisteínas en su molécula, lo que ha facilitado en gran manera la obtención del alérgeno recombinante en *E. coli* perfectamente plegado y con un alto rendimiento (Ledesma *et al*, 1998a).

Ole e 3 consiste en una cadena simple de 84 aminoácidos, que muestra un alto contenido de estructuras ordenadas periódicamente, principalmente hélices α . Más detalladamente, y según los trabajos de Batanero y colaboradores en 1996, el alérgeno Ole e 3 muestra una estructura secundaria compuesta por 52% de hélices α , 10% de láminas β , 29% de plegamientos β y un 9% de conformación irregular (Batanero *et al*, 1996)

El metabolismo del Ca^{2+} juega un papel crítico en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico. De este modo, el nivel de Ca^{2+} intracelular y sus efectos deben ser estrictamente controlados. Muchas proteínas ligantes de Calcio están implicadas en este control. Proteínas tales como Ole e 3, que presentan dos sitios de unión al Ca^{2+} podrían jugar un importante papel en los procesos celulares que afectan a las funciones reproductivas del polen (Batanero *et al*, 1996)

4.2.8.13.4. Ole e 4 y Ole e 5

Estos dos alérgenos fueron purificados y parcialmente caracterizados por Boluda y colaboradores en 1998. Ole e 4 tiene un peso molecular aparente de 32 kDa, y al menos dos isoformas con pI entre 4,65 y 5,1 y el análisis de la secuencia de aminoácidos demuestra que no tiene homología con otras proteínas conocidas. Ole e 5 tiene un peso molecular de 16 kDa y al menos 5 isoformas con pI entre 5,1 y 6,5. La secuencia aminoacídica muestra un alto grado de homología con superóxido dismutasas de varias especies de plantas (espinaca, maíz, tomate). (Boluda *et al*, 1998) (Carnés, 2002)

La fijación a IgE de Ole e 4 y Ole e 5 se ha estudiado por inmunoblotting no alterándose su alergenicidad durante los pasos cromatográficos ya que retienen su capacidad de unión a IgE específica. Ole e 4 fija mayores cantidades de IgE

(80%) que Ole e 5 (35%) por inmunoblotting, aunque capturan cantidades similares de IgE en ensayos de fase sólida (Feo, 2003).

Según las pruebas realizadas en 2002 por Carnés *et al*, se sugiere la posibilidad de que Ole e 1 y Ole e 4 compartan epítomos antígenicos y alergénicos aunque Ole e 1 es 7,6 veces mas potente que Ole e 4, referido al extracto total. Ole e 4 es 17,6 veces menos potente que el extracto total.

4.2.8.13.5. Ole e 6

Ole e 6 es una pequeña proteína ácida compuesta de una única cadena polipeptídica de 50 aminoácidos con función desconocida y altamente polar debido a que presenta 22 residuos cargados de la cual no se tiene evidencia de diferentes isoformas (Batanero *et al*, 1997). Presenta una secuencia aminoacídica que contiene dos grupos de motivos secuenciales Cys-X₃-Cys-X₃-Cys (6 residuos Cys que hacen un 12% del total de aminoácidos) y muestra similitud con una secuencia polipeptídica deducida del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Batanero *et al*, 1997). Ole e 6 no parece compartir epítomos con otros pólenes alergénicos, lo cual hace a Ole e 6 un buen candidato para ser incluido en vacunas sintéticas para la polinosis por olivo ya que no se esperan homólogos significativos ni secuencias similares en otras plantas (Treviño *et al*, 2004)

El plegamiento global de Ole e 6 consiste en dos α -hélices antiparalelas comprendiendo los residuos 3-19 y 23-33 unidos por un pequeño lazo y mantenidos con la ayuda de tres puentes disulfuro y una larga e inestructurada cola C-terminal. El ángulo medio formado entre estas dos hélices es de 140°.

4.2.8.13.6. Ole e 7

Ole e 7 es una proteína transportadora de lípidos, muy soluble ya que se libera del polen del olivo en los primeros pasos de la extracción salina, con una masa molecular aparente en SDS-PAGE prácticamente idéntica a la de Ole e 6 (10,0 kDa) y muy cercana a la de Ole e 3 (9,5 kDa). Mediante secuenciación del extremo N-terminal, de dos isoformas, y por degradación de Edman, se han

determinado los primeros 22 aminoácidos, encontrándose una notable heterogeneidad en la misma, hecho que se ha confirmado mediante el análisis por espectrometría de masas, y sin homología con proteínas conocidas de las bases de datos, lo cual indica que Ole e 7 tiene una importancia clínica significativa ya que el 47% de los pacientes del estudio de Tejera *et al*, en 1999 (de un total de 164) fueron sensibles a este alérgeno. La prevalencia de Ole e 7 parece estar relacionada con el área geográfica, al igual que Ole e 6. De hecho, se obtienen valores mayores del 60% para pacientes de Jaen, mientras que estos valores no alcanzan el 20% si el área considerada es Madrid. (Quiralte *et al*, 2007) (Tejera *et al*, 1999).

Ole e 7 consta de una cadena polipeptídica polimorfa de 88 aminoácidos. El polimorfismo es frecuente en los alérgenos y muy destacable en aquellos alérgenos principales, tales como Bet v 1 de *Betula* y Ole e 1 del olivo. El número de isoformas de Ole e 7 es alto, según se deduce de la elución por HPLC, espectrometría de masas y de microheterogeneidad de secuencia (Quiralte *et al*, 2007) (Tejera *et al*, 1999).

4.2.8.13.7. Ole e 8

Otro alérgeno de la familia de los ligantes del Calcio es Ole e 8, que además se detecta en el alérgeno mayoritario de *Juníperus oxicedrus* (Jun o 2), por lo que podría contribuir a la presencia de reactividad cruzada entre ambos taxones poínicos.

Según los trabajos de Huecas *et al*, en el año 2001, Ole e 8 es una proteína con un peso molecular de 18,8 kDa y, como la Ole e 3, lleva asociada cuatro sitios de unión para el Ca^{2+} (motivos EF-hand). Según los trabajos de Ledesma *et al*, en los años 2000 y 2002, el alérgeno se presenta en el extracto de polen bajo la forma de un monómero de 20 kDa, con 171 aminoácidos, aunque tiene una fuerte tendencia a dimerizar y a ser eluido de las columnas de exclusión (columnas de afinidad de Sephadex G-150 y Phenyl-Sepharose) principalmente como un dímero de 40 kDa, cuya forma se mantiene en los análisis cromatográficos. Esta propiedad podría ser debida a la presencia de una Cys libre

en la posición 132 de la cadena polipeptídica (Huecas *et al*, 2001) (Ledesma *et al*, 2000) (Ledesma *et al*, 2002).

Los niveles de Ole e 8 son muy bajos en el polen de olivo, 15-40 μg por cada cien de polen seco (0,02% - 0,05% del total proteico). Esta proteína es un buen ejemplo de interés en producir alérgenos recombinantes ya que a partir del polen se pueden obtener cantidades ínfimas de Ole e 8, mientras que mediante técnicas de biología molecular en *Escherichia coli* se pueden obtener cantidades importantes, del orden de miligramos, de alérgeno recombinante puro. En contraste, aislar Ole e 8 del polen es difícil debido a la baja concentración de la proteína y a la abundante presencia de Ole e 1, con el cual comparte masa molecular y ácido pI (Ledesma *et al*, 2002).

Una dificultad adicional para aislar Ole e 8 es la ausencia de sueros de personas alérgicas que muestren reacción positiva únicamente a este alérgeno. Ole e 8 muestra una baja prevalencia si lo comparamos con otros alérgenos del polen de olivo (Ledesma *et al*, 2002).

Todos los sueros reactivos a Ole e 8 también lo son a Ole e 3, que también es una Calmodulina, aunque contiene solo dos sitios EF-hands. Aunque las secuencias de aminoácidos de Ole e 3 y Ole e 8 son muy diferentes, y solo muestran similitud en los motivos EF-hands, no se puede excluir la posibilidad de que compartan determinantes antigénicos.

Ole e 8 muestra una baja identidad en la secuencia de aminoácidos con otras Calmodulinas fuera de los motivos EF-hands. La mayor similitud ha sido observada con Jun o 2, un alérgeno principal de *Juniperus* que también tiene cuatro sitios EF-hand, con el que podría presentar reactividad cruzada (Ledesma *et al*, 2000).

4.2.8.13.8. Ole e 9

Ole e 9, una β -1-3 glucanasa, la primera detectada en polen, de 46,4 kDa, con una longitud de 460 residuos de aminoácidos (Huecas *et al*, 2001), que

alcanza el 65% de fijación IgE en las personas alérgicas a polen de olivo, y que también podría estar implicada en la reactividad cruzada con otros alérgenos vegetales (látex, plátano,...). Es altamente soluble y se libera fácilmente después de la hidratación del polen (Rodríguez *et al*, 2002) Según los trabajos de Quiralte *et al*, del año 2005, la estructura conformacional de Ole e 9 está compuesta de dos dominios: el dominio N-terminal (36 kDa de masa molecular y aproximadamente 330 aminoácidos) y el dominio C-terminal (10,6 kDa de masa molecular y aproximadamente 100 residuos aminoácidos) conectados mediante un segmento de 10 a 15 aminoácidos de longitud. El extremo N-terminal es similar a otras 1,3- β -glucanasas (Quiralte *et al*, 2005)

Ole e 9 muestra un bajo pero significativo polimorfismo detectado por RP-HPLC y confirmado mediante secuencia nucleotídica. Este polimorfismo puede ser resultado de microheterogeneidad, no solo en la cadena polipeptídica sino en la porción de glicano como ocurre en Ole e 1 (Huecas *et al*, 2001).

El análisis predictivo de la estructura secundaria de este alérgeno arroja unos porcentajes de 19% de estructura en α -hélice, un 23% hojas- β y un 58% de conformación no periódica. El modelo muestra una alternancia de motivos α -hélice y hojas- β en los primeros 350 residuos aminoácidos de la cadena polipeptídica (Huecas *et al*, 2001).

No hay disponibilidad de Ole e 9 purificado para inmunoterapia específica y protocolos de diagnosis debido a que se genera muy poco alérgeno a partir del polen de olivo. Además, la producción de alérgeno recombinante no ha sido demasiado exitosa hasta la fecha. (Quiralte *et al*, 2007).

4.2.8.13.9. Ole e 10

Ole e 10 se presenta como una única cadena polipeptídica con peso molecular de 10 kDa, y con 102 residuos aminoácidos precedidos por un péptido señal de 21 aminoácidos que podrían ser procesados durante la maduración post-transduccional. La comparación de la estructura primaria de Ole e 10 con proteínas de los bancos de datos demuestra homología con una familia de genes

de *Arabidopsis Thaliana*, que podría codificar proteínas de diferentes longitudes, entre 110-256 aminoácidos (Barral *et al*, 2005a).

Ole e 10 muestra una similitud muy alta con el módulo C-terminal de Ole e 9. Para otras 1,3- β -glucanasas, tales como las de *A. thaliana*, la similitud disminuye dramáticamente. Ole e 10 muestra también similitud con los, así llamados, dominios Cys Box de tres familias de 1,3- β -glucanosiltransferasas implicadas en el desarrollo de levaduras (Barral *et al*, 2005a).

Mediante análisis de Dicroísmo circular se obtuvo una estructura secundaria porcentual de 17% en α -hélice, 33% Hojas β y un 21% de vueltas β . Ole e 10 muestra un comportamiento dual en SDS-PAGE, exhibiendo dos formas diferentes de movilidad. Esto podría explicarse por la existencia de dos conformaciones espaciales para su estructura tridimensional por dos razones:

1.- El alérgeno purificado muestra un único pico en los análisis de masa molecular mediante espectroscopia de masas y

2.- La forma reducida produjo una única banda en SDS-PAGE.

Ole e 10 es un alérgeno relevante debido a que presenta un 55% de prevalencia entre los pacientes alérgicos al polen de olivo y un 69,2% entre aquellos sensibilizados exclusivamente a *Olea*. Este alérgeno posee epítomos IgE conformacionales que son alterados en condiciones de desnaturalización en un porcentaje significativo de sueros (siete sueros, 35%, de un total de 20), tal y como se desprende de la pérdida completa de la capacidad de las IgE de unirse al antígeno en presencia de SDS. También muestra epítomos insensibles a este agente químico, lo cual se deduce de que el 65% de los restantes sueros diesen reacción positiva en Inmunoblotting

Ole e 10 muestra reactividad cruzada con Ole e 9. Esto se puede explicar por la similitud secuencial entre Ole e 10 y el dominio C-terminal de Ole e 9. También presenta reactividad cruzada con proteínas de otros pólenes, látex y

alimentos vegetales, lo cual se deduce de la inhibición de la unión de Ole e 10 a IgE cuando hay presentes extractos de estas proteínas (Barral *et al*, 2005a).

Ole e 10 define una nueva familia de proteínas con capacidad de unión a carbohidratos, potencialmente implicada en la germinación del polen. Aunque Ole e 10 se ha descrito como un alérgeno prevalente, los estudios llevados a cabo por Barral y colaboradores en 2005 sugieren el alérgeno en cuestión presenta una baja antigenicidad intrínseca. Este hecho, unido al retardo en la liberación de Ole e 10 del grano de polen después de hidratación (aunque la proteína *per se* es altamente soluble) se han interpretado en la base de que el alérgeno puede ser liberado del polen unido a una partícula que se comporta como un transportador, incrementando así su potencial antigénico (Barral *et al*, 2004). Aún no se ha podido demostrar que esa partícula sea un carbohidrato, pero la actividad bioquímica de Ole e 10, su co-localización con partículas de carbohidrato en el polen, así como los efectos de la inhalación de 1,3- β -glucanos descrita en humanos (en los que estos carbohidratos promueven respuestas alérgicas en las vías respiratorias) apoya la hipótesis de interacción de Ole e 10 con algún tipo de carbohidrato transportador tal como polímeros de 1,3- β -glucano que podrían incrementar su potencial antigénico y contribuir a la aparición de reacciones asmáticas en pacientes alérgicos (Quiralte *et al*, 2005)

4.2.8.13.10. Ole e 11

Hasta la fecha de la escritura de la presente memoria, el número de alérgenos descrito de *Olea* se eleva a 11, de los cuales Ole e 11 es el último en haber sido identificado, según una comunicación personal citada por Lahoz y Florido en el 2007.

4.2.8.14. Alérgenos recombinantes. Aplicaciones. Ventajas

En los últimos años, la aplicación de las técnicas de Biología Molecular a la caracterización de los alérgenos, ha mejorado notablemente el conocimiento de estos. Ha permitido la determinación de la secuencia primaria completa de muchos de los alérgenos principales y secundarios de distintas fuentes,

facilitando, por un lado, el conocimiento de su estructura química y esclareciendo muchas incógnitas planteadas como la existencia de proteínas homólogas e incluso de epítomos comunes en fuentes próximas o alejadas filogenéticamente, y por otro lado, permitiendo la obtención de los correspondientes alérgenos recombinantes, con características moleculares e inmunológicas idénticas a los del alérgeno natural y que, por tanto, serían aplicables tanto en la diagnosis como en la terapia de las reacciones alérgicas (Huecas, 2001).

Una de las metas principales de la investigación en alergología es la mejora de las herramientas para la diagnosis e inmunoterapia específica. Muchos de los extractos de alérgenos convencionales utilizados en la diagnosis *in vitro* e *in vivo* se obtienen de fuentes biológicas y constan de una mezcla de componentes alergénicos con grandes cantidades de productos indeseables que pueden interferir con la diagnosis. Además, contienen cantidades variables y desconocidas de alérgenos que pueden, a veces, estropearse por proteólisis u oxidación. Por el contrario, las mezclas de alérgenos purificados pueden ser utilizadas dentro de parámetros bien definidos, así como también pueden controlarse la concentración e integridad, impidiendo de este modo, los problemas relacionados con la variabilidad de la composición de diferentes lotes, bajas concentraciones de muchos componentes alergénicos o la prevención de nuevas sensibilizaciones (Rodríguez *et al*, 2007)

Aunque el mecanismo de acción de la inmunoterapia clásica no se conoce totalmente, la meta es originar en el paciente una desensibilización progresiva a aquellos alérgenos que son reconocidos por sus anticuerpos IgE. Algunos investigadores (Valenta *et al*, 1999) han propuesto para una inmunoterapia más eficaz el uso de alérgenos recombinantes de forma que, en un tratamiento realista, a cada paciente se le inyecte una mezcla de alérgenos frente a los cuales produce cantidades considerables de IgE.

Otros autores han sugerido el uso de las llamadas formas hipoalergénicas (derivados no anafilácticos de alérgenos) para el tratamiento de la alergia. Lo ideal es que estas no tengan capacidad para unir IgE o que la tengan muy disminuida,

pero que mantengan la capacidad de estimular linfocitos T disminuyendo el peligro de posibles reacciones anafilácticas. Estas formas hipoalergénicas pueden ser bien isoformas del alérgeno (Ferreira *et al*, 1996), o formas recombinantes cuyo DNA ha sido alterado mediante mutagénesis dirigida, como se ha descrito para los alérgenos de ácaros del polvo, Der p 2 (Smith *et al*, 1996) o bien alérgenos que han sido modificados química o estructuralmente (Akdis *et al*, 2000).

Otra alternativa sería el uso de péptidos derivados de alérgenos, que pudiesen disminuir el riesgo de una reacción anafiláctica. Se ha demostrado con los alérgenos Fel d 1 de pelo de gato (Brinner *et al*, 1993) y Der p 1 del ácaro del polvo D. pteronyssinus que, cuando se administran a ratones péptidos que contengan los principales epítomos T, se vuelven tolerantes al alérgeno completo (Hoyne *et al*, 1993).

4.2.8.14.1. Diseño y producción de alérgenos recombinantes del polen del olivo

Se han usado cuatro sistemas para la expresión recombinante de alérgenos del polen de olivo:

- a) La bacteria *Escherichia coli*.
- b) La levadura *Pichia pastoris*.
- c) Células del insecto *Spodoptera frugiperda*, y
- d) plantas de *Arabidopsis thaliana*.

a) *Escherichia coli*:

Se ha utilizado con éxito para producir proteínas tales como Ole e 3 u Ole e 8, que no necesitan maduración postraslacional. Sin embargo, estas bacterias no tienen mecanismos adecuados para la fijación de glucanos a cadenas polipeptídicas, y las glicoproteínas se expresan como derivados libres de azúcar. Además, el medio reductor del citoplasma de *E. coli* hace difícil la formación de puentes disulfuro. De este modo, alérgenos tales como Ole e 1

(glicoproteína con 3 enlaces disulfuro) y Ole e 6 (pequeño polipéptido con 3 puentes disulfuro) deben ser producidos en células eucariotas.

b) ***Pichia pastoris*:**

La levadura *Pichia pastoris* se ha convertido en un sistema muy utilizado para la expresión de genes heterólogos. Se ha utilizado esta levadura para la producción de Ole e 1, Ole e 6, Ole e 9, Ole e 10 y Ole e 11. Son varios los factores que han contribuido a ello, entre los que podemos destacar (Huecas, 2001):

- i) Es un organismo eucariota unicelular lo que facilita su manipulación y cultivo. No obstante, es un sistema eucariota, mucho más complejo que los sistemas bacterianos y, por tanto, con toda la maquinaria proteica necesaria para lograr un correcto plegamiento y capaz de producir modificaciones post-transduccionales como son el procesamiento proteolítico, la formación de puentes disulfuro y la glicosilación. Además el manejo de este sistema es más rápido, fácil y económico que los sistemas de expresión derivados de formas eucariotas superiores
- ii) Se puede cultivar a elevada densidad celular y, generalmente, se consiguen niveles de producción muy elevados.
- iii) Las técnicas necesarias para la manipulación genética de *P. pastoris* son muy similares a las necesarias para el manejo de *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los sistemas mejor caracterizados en la biología actual.
- iv) Posee un promotor derivado de la enzima alcohol oxidasa I (AOXI) que resulta ser muy conveniente para la expresión controlada de genes ajenos y la selección de sus productos.
- v) En *P. pastoris*, las proteínas pueden ser expresadas intracelularmente, o bien secretadas al medio. Ya que *P. pastoris* secreta muy pocas proteínas endógenas y que el medio

de cultivo no necesita proteínas adicionales, la secreción se puede considerar como un primer paso en la purificación. Aún así, la secreción queda limitada para proteínas que sean secretadas por su fuente natural y que, por tanto, posean una secuencia señal de transporte al exterior celular, o bien, implica el uso de una secuencia de secreción específica de la propia levadura. Una de ellas es el péptido “prepro factor α ” de *S. Cerevisiae*.

c) *Spodoptera frugiperda*:

Aunque Ole e 10 se ha generado en levaduras de *Pichia pastoris*, los mejores resultados se han obtenido mediante el uso de células de *Spodoptera frugiperda* combinadas con *Baculovirus*. El cDNA de Ole e 10 se ha insertado en el vector de transferencia pBacPAK8 permitiendo la expresión de la proteína recombinante en cultivos de células Sf21. El Ole e 10 recombinante (rOle e 10) se purifica del cultivo por diálisis y cromatografía en tres pasos. Mediante espectrometría de masas, degradación de Edman y análisis de enlace a IgE e IgG se caracteriza el alérgeno recombinante, el cual muestra equivalencia molecular e inmunológica con la proteína natural (Rodríguez *et al*, 2007).

d) *Arabidopsis thaliana*:

En esta planta se han producido ambos, Ole e 3 y Ole e 8, presentando la misma integridad inmunológica que los alérgenos naturales. Este sistema de expresión presenta ventajas de producción porque posee una maquinaria post-translacional análoga a la de la fuente natural de los alérgenos del polen del olivo (Ledesma *et al*, 2006).

4.2.9. Polinosis

La polinosis es una enfermedad alérgica provocada por los granos de polen de diversas especies vegetales en individuos genéticamente predispuestos. Se presenta cuando los granos de polen son expuestos al individuo en forma

constante sensibilizándolo, produciendo alergia respiratoria, cutánea o conjuntival (Guidos, 2005), por lo que la manifestación clínica clásica la constituyen los ataques de rinitis y conjuntivitis alérgica (fiebre del heno), siendo muy frecuente también la aparición de cuadros de asma. La incidencia de la polinosis está muy influida por factores ambientales, principalmente los que caracterizan la zona fitogeográfica estudiada, y por las características del polen (Huecas, 2001)

Para demostrar que un alérgeno es la causa del asma de un paciente es necesario, en primer lugar, objetivar que el paciente está sensibilizado a un alérgeno, que este se encuentra en el entorno del paciente y que al separar al paciente del alérgeno se produce una mejoría clara (Tabla 4.14). Las pruebas cutáneas son sensibles, seguras y útiles no sólo en el diagnóstico del perfil alérgico del asma, sino para la relación con otras variables clínicas o funcionales

Tabla 4. 14 Cómo demostrar que un alérgeno es causa de asma
(Duce, 1999)

<p>1. Diagnóstico de sensibilización</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pruebas cutáneas. • IgE específica (Rast-Ella. Cap). • Provocación bronquial específica. <p>2. Demostración de la presencia del alérgeno causal en el entorno del paciente.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pólenes: cronología de la sintomatología. Conocer el mapa polínico de la zona de residencia. • Ácaros: Dea-test. Cuantificar alérgenos Der p I, Der f I y Fel d I en polvo de casa (anticuerpos monoclonales). Acafe-test: determinación de guanina en polvo de casa. • Epitelio de animales: presencia del animal en casa o en el trabajo. <p>3. Mejoría clara del paciente al separarlo del alérgeno. (Fácil de comprobar con pólenes y animales domésticos).</p>

Una característica importante de la polinosis es su periodicidad anual, con síntomas que normalmente suceden durante el mismo período cada año, durante la polinización. La sensibilización a los alérgenos de polen puede ocurrir aislada o asociada con sensibilización a otros alérgenos perennes, tales como

alérgenos de los ácaros del polvo, hongos y epitelios de animales y cucarachas, por ejemplo. Los síntomas pueden ocurrir solo durante la primavera, durante la estación polínica, o a lo largo del año (en cuyo caso los síntomas se recrudecen durante la primavera). La alergia al polen puede no ser aparente al estar enmascarada por otros procesos de sensibilización, alterando el cuadro clínico en ciertos casos (Taketomi *et al*, 2006).

La repetición de los síntomas clásicos de rinoconjuntivitis asociados o no con asma bronquial en dos o más estaciones polínicas es un fuerte indicador de polinosis.

La profilaxis es extremadamente difícil en la polinosis. Es difícil reducir o impedir la exposición ambiental, ya que la gente normalmente vive y trabaja en el mismo medio en donde se encuentra el alérgeno. Cuando la cantidad y propagación de polen en la atmósfera es significativa, tal como ocurre en períodos secos, cálidos o días con viento, se recomienda que los pacientes permanezcan en lugares cerrados y, si es posible, con aire acondicionado filtrado y que usen gafas cuando viajen en bicicletas o motocicletas. Otras acciones incluyen mantener las ventanas de los vehículos cerradas, evitar paseos por el campo y evitar los trabajos de jardinería (Taketomi *et al*, 2006).

4.2.9.1. Polinosis en el area mediterránea

Debido a sus condiciones climáticas, caracterizadas por inviernos templados y días soleados con veranos secos, la vegetación del área Mediterránea es diferente de la del centro y norte de Europa (D'Amato *et al*, 2007), lo cual promueve el crecimiento de una vegetación típica con la presencia de varias especies alérgicas, tales como *Parietaria judaica* (Urticaceae), *Olea europaea* (Oleaceae), varios miembros de la familia Cupressaceae, junto con *Artemisia* y varias especies pertenecientes a la familia de las gramíneas (D'Amato *et al*, 1998).

El análisis del contenido en polen de muestras aerobiológicas recogidas en varias ciudades mediterráneas permite identificar tres estaciones polínicas:

1. Invierno (diciembre a finales de marzo), marcada por la presencia de pólenes de árboles como el ciprés (*Cupressus sempervirens*), el enebro (*Juniperus communis*), la mimosa (*Acacia spp.*), el abedul (*Betula verrucosa*) y el avellano (*Corylus avellana*).

2. Primavera y verano (abril-julio) son las estaciones más importantes desde el punto de vista alergológico, dominadas por la polinización de gramíneas, *Parietaria* y oleáceas.

3. Verano y otoño (agosto-octubre): *Parietaria*, algunas gramíneas y otras plantas herbáceas.

Aunque las gramíneas son la principal causa de polinosis en el área mediterránea, otros pólenes como *Parietaria*, oleáceas y, en menor medida, las cupresáceas, juegan un papel importante en esta zona. En cambio en Europa central y en las zonas atlánticas las alergias más frecuentes se dan frente a la familia betulácea, que incluye géneros como el abedul, el avellano y el aliso (Corsico, 1993).

En lo referente a nuestra zona, los síntomas de polinosis más frecuentes en región de Murcia son los rinoconjuntivales, presentándose el asma con menor frecuencia. Los resultados de las pruebas cutáneas frente a pólenes ponen de manifiesto el alto grado de polisensibilización existente en nuestra región. La sensibilización más frecuente es a *Olea*, 66,91% de los polisensibilizados, seguida de Chenopodiaceae, 64,98% de los polisensibilizados, Poaceae, 51,02% de los polisensibilizados, Urticaceae, 37,01% de los polisensibilizados y Asteraceae, 27,97% de los polisensibilizados (Moreno-Grau *et al*, 2002).

Alergia al polen de olivo

El cultivo del olivo se originó probablemente hace más de 6.000 años en Oriente Medio (Pinto *et al*, 2005) como resultado de la intervención humana en las formaciones de acebuche (*Olea europaea*, var.; *Oleaster*) del primigenio bosque mediterráneo. Su difusión se realizó de Oriente a Occidente a través de las dos orillas del mar Mediterráneo. Los primeros olivicultores de cada zona seleccionarían los individuos más sobresalientes de acebuche por su

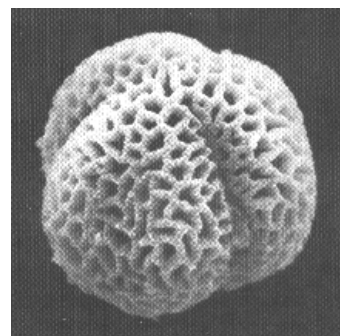
productividad, tamaño del fruto, contenido en aceite y adaptación al medio. La propagación vegetativa ha mantenido las características de esos cultivares inicialmente seleccionados que constituyeron las primeras variedades (Barranco *et al*, 2001).

España es el país en donde el olivar ocupa la mayor extensión, en el ámbito mediterráneo, y el principal productor de olivas. Sólomente Italia la ha desplazado del primer lugar cortos períodos de tiempo. El olivar, en régimen de monocultivo en extensas zonas, se extiende mayoritariamente por Andalucía con el 60% de la superficie ocupada (Barranco *et al*, 2001), siendo las provincias de Jaén, Córdoba, Málaga y Sevilla las que mayor superficie dedican al cultivo.

El polen de olivo es pequeño (entre 17-21 μm de diámetro), esférico, isopolar y tricolporado. El contorno ecuatorial es subtriangular y el meridional es circular o ligeramente elíptico. Posee una exina gruesa y reticulada, típica de la familia de las oleáceas:

Figura 4. 15 Micrografía electrónica del polen de olivo.

<http://www.uco.es/rea/part-alergogenas/grligus1.gif>



La polinización del olivo es entomófila, pero también es anemófila cuando la producción de polen es abundante (D'Amato *et al*, 1988). El periodo de polinización, aunque puede darse desde finales de enero hasta junio, dependiendo de la latitud y de las condiciones climáticas locales, suele tener lugar entre mediados de abril y finales de junio. En cualquier caso, el periodo de polinización no es muy largo, siendo su duración aproximada de unos 40 días.

La cantidad de polen producido cada año depende de varios factores climáticos, siendo también importante la “alternancia de producción” (vecería). Este fenómeno agronómico, característico del olivo y de otras especies arbóreas, depende esencialmente de la competencia entre la maduración del fruto y el

desarrollo de la yema (Fortuny *et al*, 2002) La concentración atmosférica de polen más frecuente en el área mediterránea varía entre 100-200 granos/m³, aunque se han recogido hasta 4500 granos/m³ en aquellas zonas donde hay grandes extensiones cultivadas de este árbol, como Jaén en España o Apulia en Italia (Rodríguez *et al*, 2005).

4.2.9.2. Diagnóstico

Para un correcto diagnóstico de los procesos alérgicos producidos por el polen de olivo, es fundamental la realización de una historia clínica detallada que incluya, entre otros: edad de aparición de los síntomas, antecedentes familiares, evolución de la sintomatología y, sobre todo, la época del año en que se manifiestan los síntomas, que deben ser más evidentes cuando el paciente está al aire libre y menos en los días de lluvia, siendo su intensidad directamente proporcional a la cantidad de polen presente en la atmósfera (Guidos *et al*, 2005)

Hasta la fecha, el diagnóstico de las distintas sensibilizaciones de las personas alérgicas se ha realizado con los extractos crudos, preparados a partir de las fuentes alergénicas naturales, y en muy pocos casos estandarizados y de composición conocida. Estos extractos son útiles para determinar los pacientes sensibilizados a esa fuente biológica, y para medir la cantidad de IgE total del paciente frente al conjunto de alérgenos presentes en ella. Pero el uso de estos extractos tiene algunos inconvenientes. Por un lado, las fuentes alergénicas y, en especial los pólenes, contienen además de los alérgenos y otras proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos y pigmentos que en principio no son responsables de la sensibilización del paciente, pero que dificultan en gran manera la preparación de los extractos y su eficacia en el diagnóstico. Además, algunos alérgenos que están presentes en cantidades muy pequeñas, no quedan bien representados o incluso pueden sufrir degradación durante el proceso de preparación del extracto, por lo que resulta difícil su estandarización (Bousquet, *et al*, 1998). Por ello, si fuera posible disponer de un número limitado de alérgenos recombinantes, que retuvieran la mayoría de los epítomos presentes en los extractos alergénicos naturales, se simplificaría notablemente la diagnosis de estas

afecciones. En esta línea, varios grupos han demostrado que un reducido número de alérgenos recombinantes puede ser suficiente para la diagnosis de la polinosis a árboles y gramíneas (Niederberger *et al*, 1998). Además empleando alérgenos recombinantes y realizando ensayos in vitro se podría determinar los alérgenos concretos frente a los que está sensibilizado cada paciente (alergograma), lo que podría conducir además al diseño de tratamientos terapéuticos personalizados.

4.2.9.3. Pruebas cutáneas.

Las indicaciones de las pruebas cutáneas se basan en una correcta historia clínica, confirmando o no la sospecha de una hipersensibilidad mediada por IgE. La existencia de diversas técnicas de diagnóstico de laboratorio no ha disminuido su importancia diagnóstica, ya que destaca su bajo coste, simplicidad, rapidez de realización, alta sensibilidad y seguridad. Aunque la cantidad de alérgenos a probar puede ser enorme, la selección de los alérgenos se realizará en función de los datos de la anamnesis sobre el medio ambiente del paciente (Duce, 1999).

Desde un punto de vista histórico existen tres métodos de realización de pruebas cutáneas: escarificación, intradermoreacción y Prick-test. La escarificación no ofrece ninguna ventaja sobre los otros dos métodos, careciendo actualmente de utilidad en la práctica clínica habitual. También son destacables el test del parche en el que se realiza un test epicutáneo in vivo por medio del cual se aplican diversos antígenos sobre la piel normal (Ardusso, 2002), el test de fricción, utilizado si se sospecha de una sensibilidad extrema y los tests de provocación de mucosas en los que se ponen en contacto el alérgeno con las mucosas conjuntival y/o nasal

El Prick-Test es la prueba cutánea que se usa en la actualidad por el método descrito en 1979 por Osterballe y Weeke. Se coloca una gota de cada extracto alergénico que se investiga y soluciones de control positivo y negativo en la superficie volar del antebrazo, con una separación de 2 ó 3 cm. Después se utiliza una lanceta con una punta de un milímetro y unos topes a los lados para que sólo la punta penetre en la piel atravesando la gota del extracto. Al cabo de 15

minutos se valora el tamaño del habón para cada uno de los alérgenos estudiados (Duce, 1999).

Las pruebas intradérmicas se practican con jeringuillas desechables de 0,5-1 mL. Se emplea una aguja de calibre fino (< 28). Con esta técnica la cantidad de antígeno a la que se expone el paciente es muy superior a la que tiene lugar con la de Prick-test. Es un método utilizado cuando la concentración de alérgenos es muy baja (Duce, 1999).

4.2.9.4. Pruebas sanguíneas

Dentro de las pruebas que normalmente se realizan en los análisis sanguíneos destacan dos:

- Determinación del número de granulocitos eosinófilos por unidad de volumen de sangre. Una de las características de la hipersensibilidad es la eosinofilia, detectada fácilmente mediante recuento de eosinófilos. Se toma como valor normal hasta $0,5 \cdot 10^9$ células/L (hasta un 4%), aunque un número mayor no es patognomónico de alergia ya que se presenta en otras muchas alteraciones.

- Determinación de Ig E sérica: Existen multitud de pruebas para determinar la concentración de IgE circulante. Entre ellas podemos citar:

- RAST (Radioalergoabsorción),
- RIST (Radioinmunoabsorción),
- MAST (Alergoabsorción múltiple),
- ELISA (Enzimoinmunoensayo)
- CAP (Una modificación de RAST más sensible)

Todas estas técnicas permiten saber si existen anticuerpos contra determinado antígeno en suero y además su cuantificación. Existe una gran variedad de antígenos que se pueden probar. Puede dar falsos negativos debido a anticuerpos bloqueantes. Los falsos positivos son raros (Peláez *et al*, 2004).

4.2.9.5. Tratamiento: evitar el alérgeno

En las épocas de polinización conviene:

- Cerrar ventanas.
- Tener las ventanillas cerradas en el coche.
- Reducir al mínimo las actividades al aire libre.
- No colgar la ropa al aire libre para secarla porque el polen se deposita y acumula en ella.
- Limpiar los filtros de aire acondicionado muy frecuentemente.

4.2.9.6. Tratamiento farmacológico

- Epinefrina: utilizado en los procesos de anafilaxia, principalmente en las intoxicaciones de tipo alimentario.

- Antihistamínicos: son fármacos que bloquean los receptores de la histamina reduciendo o eliminando sus efectos. La histamina es un mediador químico que el cuerpo libera en las reacciones alérgicas. Aunque existen cuatro tipos de receptores de la histamina, H1, H2, H3 y H4, se conoce comúnmente como antihistamínicos a los antagonistas de los receptores H1, relacionados con la rinitis o dermatitis alérgica.

- Antiinflamatorios esteroideos (Aspirina e Ibuprofeno) y no esteroideos (Cromolina sódica y nedocromilo sódico). Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas. Se utilizan como broncodilatadores en los procesos asmáticos.

4.2.9.7. Tratamiento inmunológico:

Consiste en la desensibilización o hiposensibilización. La terapia es inyectar el alérgeno específico regularmente a concentraciones crecientes hasta lograr la ausencia o disminución en el organismo de la reactividad. Actualmente se administra por vía subcutánea, sublingual o intranasal.

4.2.9.8. Tratamientos alternativos

Existen actualmente muchas formas para combatir o atenuar los síntomas alérgicos. Las *flores de Bach* y la *aromaterapia*, así como la *homeopatía*, el *yoga* y la *meditación* son algunos ejemplos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. Material y métodos

Los datos aerobiológicos correspondientes a los años 2000-2007 se han obtenido utilizando dos equipos de captura ubicados en el mismo lugar y que funcionan simultáneamente: Captador tipo Hirst de la casa Lanzoni, modelo VPPS 2000 y un captador ciclónico Burkard de bajo volumen.

Ambos aparatos se hayan instalados en le terraza de la estación de trenes que RENFE tiene en Cartagena, situada a 0° 59' longitud W, 37° 36' latitud N y a una altura de 10 metros, sin jardines o parques en sus proximidades. El área que rodea a los captadores está urbanizada, entre colinas pequeñas y el mar Mediterráneo. Su posición fitoclimática es de vegetación típica Mediterránea, provincia Murciano-Almeriense.

5.1. Métodos volumétricos de captación

Se han utilizado métodos volumétricos de captación dado que son los únicos que nos permiten relacionar cantidad de polen captado o de alérgeno recogido con volumen de aire aspirado.

Para nuestro estudio de pólenes y alérgenos aerovagantes se ha utilizado un captador tipo Hirst y un captador ciclónico Burkard de bajo volumen que recoge la muestra en un vial Eppendorf directamente y en seco (Emberlin, 1995).

5.1.1. Principio de captación por impacto activo

En la unidad de monitorización aerobiológica de Cartagena perteneciente al grupo de investigación de Aerobiología y Toxicología Ambiental del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT, como miembro perteneciente a la REA (Red Española de Aerobiología), se utilizan de forma normalizada captadores de partículas volumétricos por succión, basados en el principio del impacto activo (Hirst, 1952). Estos captadores permiten obtener datos homologables independientemente de las características biogeográficas y bioclimáticas de la zona en la que se realice el muestreo (Galán *et al*, 2007). Estos aparatos permiten asimismo, obtener datos horarios a lo largo de todo el día. Se

trata de un sistema de monitorizaje utilizado por todos los grupos de trabajo de los diferentes países componentes en la European Aeroallergen Network (EAN) en la cual se encuentra integrada la REA. El objetivo principal ha sido, desde 1993 hasta la actualidad, crear una base de datos sobre el contenido de polen y esporas en el aire a través de un registro continuo de la atmósfera mediante el uso de un captador que facilite la detección de estas partículas (Galán *et al*, 2007).

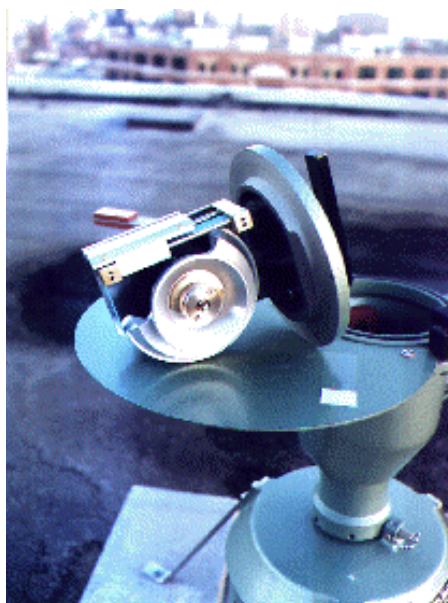
Este método se basa en el impacto de una masa de aire sobre una superficie captadora, que se desplaza a la velocidad de 2 mm a la hora. La corriente de aire, en este caso, es activa gracias a una bomba de aire colocada debajo del colector. El aire entra por un orificio anterior e impacta sobre una superficie dispuesta verticalmente, constituida por una cinta transparente, impregnada por sustancias adhesivas (Figuras 5.1 y 5.2).

Este método es útil porque la cinta puede permanecer durante una semana expuesta al aire. Gracias a los dispositivos mecánicos del aparato, el movimiento continuo de la misma permite separar las capturas diarias y, también, hacer una aproximación horaria de las mismas. Por contra, debe tenerse especial cuidado en el montaje de la cinta para la observación microscópica, evitando la formación de burbujas y preparando montajes no demasiado gruesos. El caudal de succión ajustado para realizar el análisis de las partículas aerotransportadas en aire es de 10 litros/min, similar al volumen de inhalación de aire por el pulmón humano.

El equipo dispone de un tambor rotatorio, que gira a razón de 2 mm/hora sobre una cinta de Melinex recubierta con una silicona adhesiva, con lo que las partículas de rango 2-200 μm quedan adheridas en la superficie. En el laboratorio, esta cinta es cortada en secciones de 48 mm, correspondientes a las 24 horas de cada día del muestreo semanal. Posteriormente, cada fracción diaria es montada con glicerogelatina sobre portaobjetos que son observados

microscópicamente, realizándose 4 barridos longitudinales con el objetivo de inmersión 50x y el ocular 10x, ayudados por el objetivo 100x para la identificación completa de los taxones polínicos.

Figura 5. 1 Captador Hirst



El microscopio utilizado es el Zeiss modelo Axioskop 2 Plus, provisto de óptica plan-acromática.

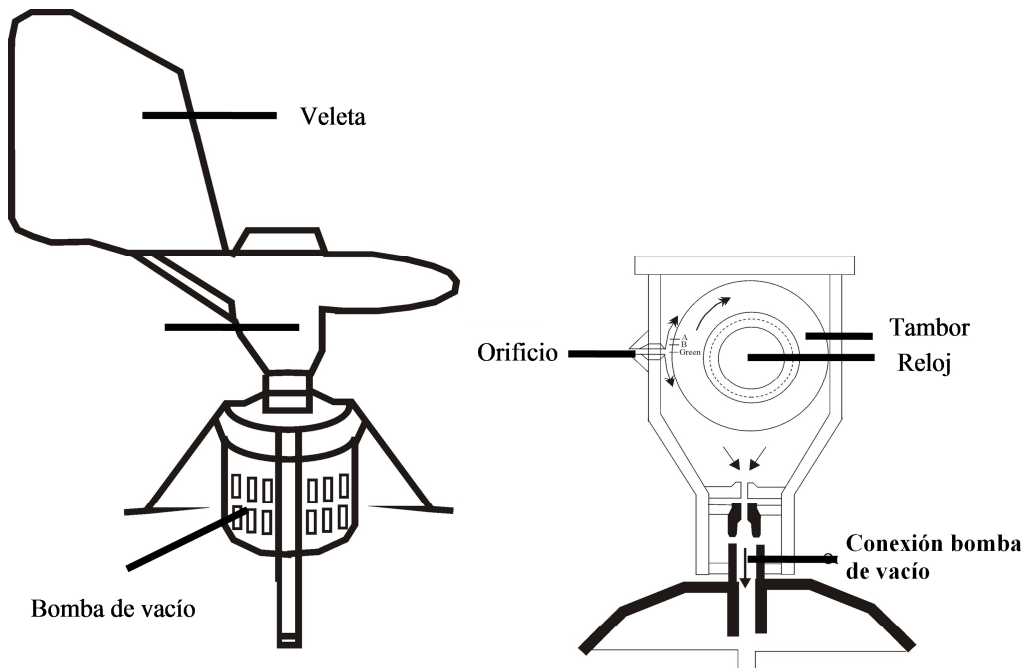
5.1.1.1. Mantenimiento del equipo: manual de calidad

Para asegurar un constante flujo del equipo se comprueba todas las semanas el funcionamiento de la bomba y se revisan las diferentes partes del equipo cuando se realiza el cambio de la cinta (Galán *et al*, 2007):

1. **Medida del caudal de entrada y salida.** Anotar valor e incidencias.
2. **Mantenimiento del orificio de entrada de aire.** El orificio de la toma debe inspeccionarse cada vez que la superficie colectora es reemplazada, a fin de que su eficiencia y su limpieza pueda ser verificada (para quitar cualquier posible depósito de polvo, se limpia

con el pincel mojado en un disolvente, como alcohol o acetona, o se rasca suavemente de forma periódica).

Figura 5. 2 Esquema Burkard 7 days



3. *La distancia entre la superficie colectora y el lado interno del orificio* de la toma debe tener $0,7 \pm 0,05$ mm y deben permanecer constante a todo lo largo del período de muestreo. Es importante comprobar periódicamente esta distancia, lo cual determina, si otras condiciones son iguales, la eficiencia del captador, o eficiencia de captura.

4. *Comprobar la seguridad del anclaje del equipo.* El dispositivo debe asegurar que la velocidad del movimiento sea 2 ± 0.02 mm por hora. Para una instalación correcta del captador, el cuerpo debe estar firmemente adherido a la superficie que lo sustenta, de forma que el orificio de la toma esté situado a una altura de al menos 1 m.

5. **Comprobar el correcto movimiento de la veleta.** La veleta se encuentra adosada al exterior de la estructura metálica que protege la unidad de impacto y su función es la de mantener el orificio de entrada en la dirección de los vientos dominantes. De esta manera, la eficacia de captación de las partículas que son aerotransportadas con las corrientes de aire es mayor. Después de instalar la nueva cinta y volver a poner en marcha el equipo se comprueba el buen funcionamiento de la veleta y se anota en la hoja de ruta de muestreo.

6. **Situación del captador.** Solo se revisa si al cabo del tiempo varían las condiciones del entorno o se cambia dicha ubicación.

Normas de ubicación de los captadores operativos en la Red Española de Aerobiología:

1. Se debe colocar sobre una superficie horizontal, plana, de fácil acceso.

2. Evitar que los edificios colindantes hagan de pantalla e impidan el flujo libre del aire. Se recomienda ubicar el muestreador encima de un edificio a una altura que depende de la ciudad y de la altura de los edificios circundantes al emplazamiento seleccionado.

3. Es aconsejable ubicar el muestreador a cierta elevación sobre esta superficie de instalación, para evitar asimismo los efectos del rozamiento de las capas de aire. Esto puede conseguirse con una torreta de ensamblaje que lo eleva sobre la superficie elegida. Algunos estudios revelan la existencia de turbulencias a nivel del suelo provocadas por el rozamiento de las capas inferiores del aire con la superficie del mismo.

4. Debe evitarse en lo posible la proximidad del captador a fuentes de emisión masiva de partículas, tanto fijas como móviles, de material biológico y no biológico. La existencia de poblaciones vegetales monoespecíficas en el entorno inmediato al de ubicación del equipo de muestreo propiciará la sobre-representación de algún tipo polínico sobre otros, lo que origina datos distorsionados y no representativos del radio de cobertura geográfica del muestreador. La proximidad a fuentes de material no

biológico tanto fijas como móviles puede, por otro lado, favorecer una masiva presencia de residuos en las muestras, lo que incrementa de forma considerable la dificultad en la identificación.

5. Evitar instalar el aparato cerca del borde del edificio para evitar las turbulencias generadas por el choque del viento contra el obstáculo.

5.1.1.2. Transporte de la muestra:

Una vez preparado el tambor con la cinta impregnada en adhesivo, este se transporta hasta el lugar donde se encuentra ubicado el muestreador protegido en un recipiente o porta-tambor metálico, herméticamente cerrado, para eliminar la posibilidad de contaminación durante el transporte. De esta forma también se minimizan los riesgos de roce con la cinta de Melinex.

5.1.1.3. Preparación de la muestra para su análisis

En la preparación de la unidad de toma de muestras, un primer paso tiene lugar en el laboratorio donde se dispone sobre el soporte circular, denominado tambor, una cinta de Melinex impregnada con un adhesivo. El tambor permite obtener registros durante los 7 días de la semana.

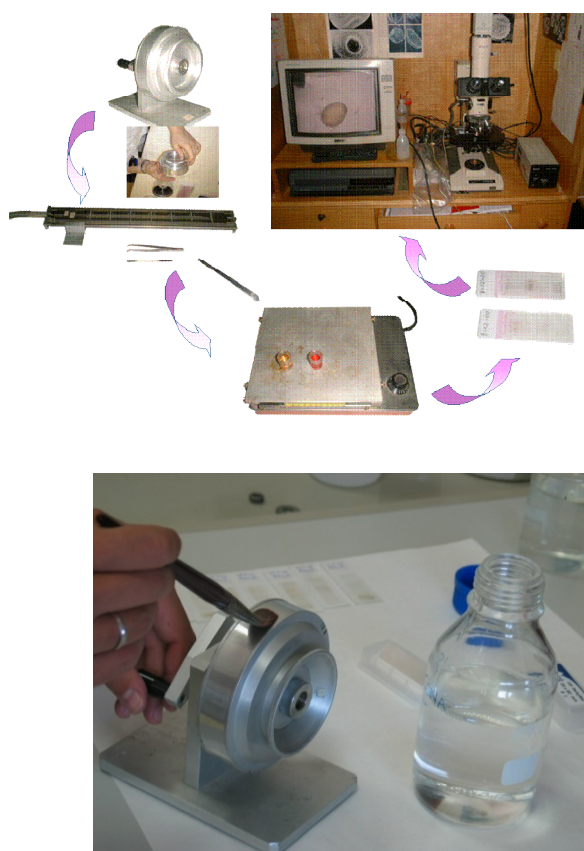
El adhesivo utilizado para la retención de las partículas succionadas debe reunir las siguientes características: 1. Debe ser insoluble en agua; 2. No debe secarse ni evaporarse; 3. El grosor de la película extendida debe permanecer inalterable en el tiempo, no cambiar con la temperatura ni con la humedad; 4. Debe tener buena capacidad de retención y evitar el rebote de las partículas impactadas; 5. No debe permitir el crecimiento de hongos ni bacterias; 6. No debe ser opaco bajo la luz del microscopio; 7. Debe ser fácil de utilizar.

Dentro del protocolo de trabajo de la REA se utiliza un fluido de silicona de la marca LANZONI s.r.l. ®. Esta sustancia, compuesta de una solución de silicona pura diluida en Tetracloruro de carbono tiene, como ventaja, entre otras características, la de permanecer inalterable en sus propiedades físicas en el rango

de temperaturas comprendido entre los -20 y los $+150^{\circ}\text{C}$, con lo cual la hace adecuada para todas las zonas bioclimáticas del país.

El adhesivo es extendido sobre la cinta de Melinex utilizando una brocha de diámetro similar al de la cinta. Esta acción debe realizarse en campana de gases debido al carácter tóxico y volátil del tetracloruro de carbono que interviene como diluyente en la mezcla de silicona.

Figura 5. 3 Aplicación de fluido de silicona sobre Melinex en el tambor.



5.1.2. Principio de captación ciclónica en seco (bajo volumen): Burkard ciclón

En este tipo de ciclón el aire, cargado de partículas, penetra en la cámara de muestreo de modo tangencial a la misma. De esta forma, las partículas de determinado tamaño abandonan el flujo del aire, impactando en las paredes, quedando, finalmente, depositadas en el fondo del tubo.

El mecanismo de captación se basa en una corriente ciclónica continua de aire generada por un flujo de 16,5 L/min a través del canal de salida del vortex en la parte superior de la cámara de captación. La corriente ciclónica conduce el aire en espiral hacia la parte inferior, en donde se encuentra el tubo Eppendorf. Las partículas, en función de su diámetro aerodinámico equivalente, tendrán mayor o menor dificultad para adaptarse a los cambios de dirección del flujo del aire, por lo que las partículas dentro de los rangos de eficacia del equipo, abandonarán el flujo del aire, quedando depositadas en el tubo Eppendorf.

Figura 5. 4 Captador ciclónico Burkard
<http://www.burkard.co.uk/cycsampl.htm>



Las características más destacables de este tipo de ciclones son:

- Bajo volumen de flujo de aire (16,5 L/min)
- Las muestras se recogen en un eppendorf o similar
- Eficacia similar a la del muestreador tipo Hirst.
- No ofrece separación por tamaños
- Bajo tiempo de tratamiento de la muestra

- Evita el problema de sobrecarga de los filtros
- Deposición del material
- Eficacia de:
 - 100% de partículas entre 3-10,6 micras
 - 98,63% para 1,06-0,87 micras
 - 93,81% para 0,87-0,75 micras (Emberlin, 1995)

El captador ciclónico Burkard tiene una relación fuertemente positiva con el captador volumétrico Burkard 7 días y para los índices de polen en el aire. Su eficiencia ha sido evaluada para otras partículas como esporas fúngicas (Larson *et al*, 2001)

El captador ciclónico Burkard ha sido evaluado por Burkard Manufacturing con partículas de polen, de carbón, y partículas radiactivas en condiciones de funcionamiento de suministro de energía constante (la corriente eléctrica alternante regulada). Si el captador ciclónico no opera en estas condiciones no puede mantener su tasa especificada de flujo. Para garantizar su buen funcionamiento, al mismo tiempo que se recogen las muestras del captador se comprueba su flujo con un rotámetro y se anota cualquier incidencia en la hoja de registro de muestreo (Mandrioli, 2000).

5.1.2.1. Recogida de las muestras:

Las muestras se recogen diariamente del ciclón en su tubo Eppendorf, etiquetado y perfectamente identificado con un código numérico. Las muestras, una vez recogidas, han sido llevadas inmediatamente a temperatura de congelación, conservándolas congeladas hasta su fecha de utilización para la extracción de alérgenos.

5.2. Métodos de análisis

5.2.1. Identificación y recuento de los granos de polen.

5.2.1.1. Montaje de las muestras diarias.

La sustancia empleada en el montaje de las muestras debe reunir las siguientes características:

1. Ser soluble en agua.
2. Ser compatible con el adhesivo en uso
3. Permitir la tinción selectiva del material que nos interesa analizar (opcional), y
4. Permitir el almacenamiento de larga duración del material.

De forma tradicional, se ha venido utilizando glicerogelatina teñida con fucsina. Su composición, según receta, incluye 50 mL de glicerina, 7 g de gelatina, 1 g de fenol y una pequeña cantidad de fucsina básica diluidos en 42 mL de agua destilada, mezclada con agitador eléctrico en campana de gases debido al carácter tóxico del fenol. La mezcla resultante es de color rosado. Este medio se ha elegido porque cumple las características mencionadas anteriormente y es compatible con la sustancia adhesiva de uso en la REA (fluido de silicona). Por otro lado, el uso de fucsina básica facilita una mejor identificación y recuento de los granos de polen, ya que esta tinción es específica para el material vegetal.

La glicerogelatina es sólida a temperatura ambiente, siendo necesario licuarla por calentamiento a para su utilización, para lo cual se ha utilizado una placa de la marca Selecta que alcanza una temperatura máxima de 160° C. La temperatura de licuefacción se sitúa en torno a los 60° C

Una vez licuada, y con la ayuda de un dispensador de gotas, se dispone una línea continua sobre el cubreobjetos, que se colocará posteriormente sobre la muestra y el portaobjetos. Es recomendable que la línea sea continua y que no queden burbujas de aire al depositarla, ya que esto haría más dificultosa la identificación y análisis. Si quedaran algunas gotas de aire dispersas sobre la superficie, con ayuda de un objeto no punzante debe presionarse ligeramente para que estas puedan desplazarse hacia los bordes antes de que la glicerogelatina se solidifique de nuevo

Figura 5. 5 Glicerogelatina sobre portaobjetos



Medio de sellado. Se recomienda el sellado de las muestras por el borde del cubreobjeto con una sustancia que permanezca inalterable a lo largo del tiempo. Para ello se utiliza laca-esmalte transparente, que reúne, entre otras cualidades ventajosas su bajo precio y fácil adquisición, fácil manejo, baja toxicidad, rapidez de secado y gran periodo de inalterabilidad. Además, al ser de color transparente, no dificulta la identificación de la muestra. Las muestras selladas, y tras ser sometidas a un análisis microscópico, pueden almacenarse en contenedores específicos para muestras de microscopía óptica denominados comercialmente combi-box.

Figura 5. 6 Sellado sobre portaobjetos y almacenamiento de muestras



Una vez montadas las muestras, es prudencial esperar un cierto tiempo antes de proceder a su lectura al microscopio. De esta manera, la glicerogelatina se solidificará actuando como adhesivo entre la cinta y el cubreobjetos. Este tiempo también favorecerá el que los distintos tipos polínicos se colorean, siendo más evidentes sus características morfológicas externas.

El análisis de las muestras se realiza a microscopía óptica a 40 ó 50 x 10 aumentos. No se recomienda un objetivo inferior ya que no permitiría una clara identificación de algunos tipos polínicos; por el contrario, un mayor aumento supone una reducción del campo a analizar. En un principio, cualquier equipo microscópico que ofrezca buena imagen y resolución es adecuado. En todo caso, se deberá definir para cada instrumento utilizado el diámetro del campo para el objetivo utilizado.

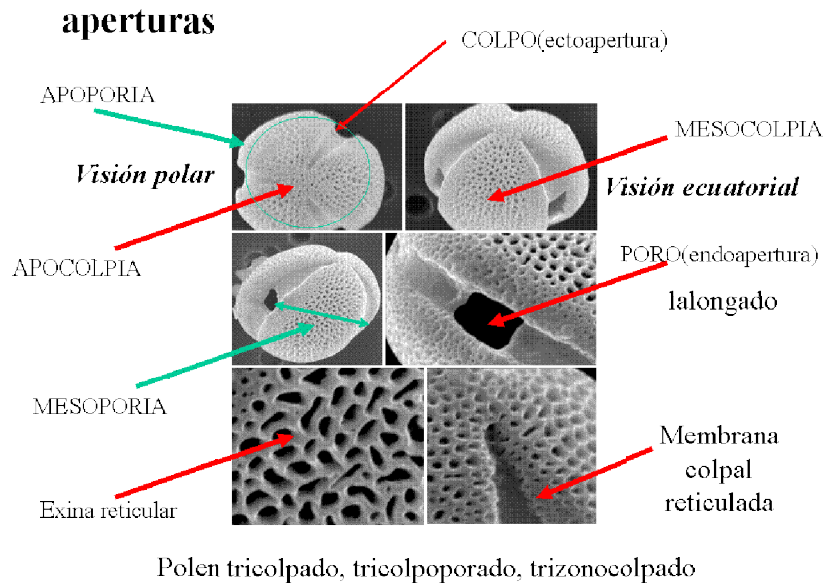
El análisis microscópico de las muestras aerobiológicas constituye un proceso fundamental en la obtención de resultados, siendo una de las etapas que más tiempo requiere debido a la elevada incidencia de material presente en ocasiones en las muestras.

5.2.1.2. Identificación microscópica de pólenes

La identificación microscópica de pólenes se realiza con las muestras obtenidas y preparadas según la metodología de Hirst como base fundamental para la obtención de datos cuantitativos reales de pólenes. Para la cuantificación se realizan 4 barridos longitudinales con el objetivo de inmersión 50x y ocular 10x, ayudados por el objetivo 100x para la identificación completa de los taxones polínicos. El microscopio óptico utilizado es el Zeiss modelo Axioskop 2 Plus con objetivo Achroplan 50 inmersión.

Los pólenes son identificados en base a sus características morfológicas, utilizando la ayuda de claves, atlas y palinoteca de referencia (Lewis *et al*, 1983) (Valdés *et al*, 1987) (Faegri *et al*, 1989) (Grant, 1990) (Reille, 1992) (Renault-Miskovski *et al*, 1987) (Suárez-Cervera *et al*, 1990) (Moore *et al*, 1991). Los caracteres morfológicos polínicos fundamentales que permiten su identificación y diferenciación microscópica son: Simetría y polaridad, unidades, forma, aperturas, tamaños y arquitectura de la pared.

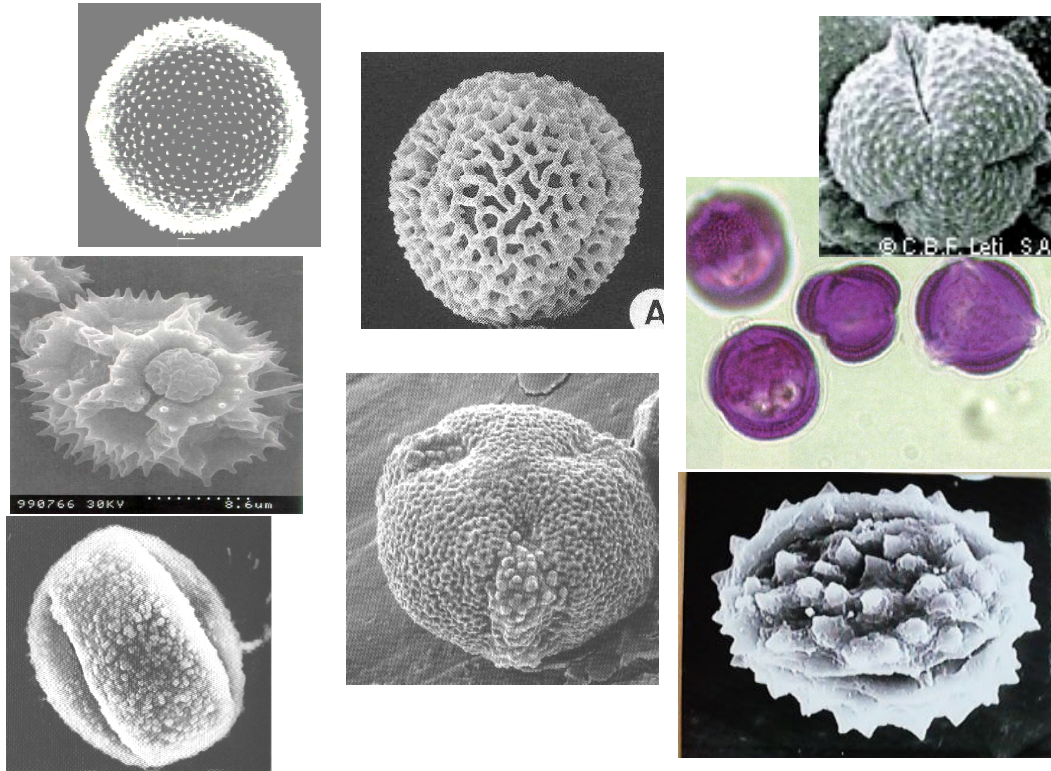
Figura 5. 7 Polen tricolpado, tricolporado, trizonocolpado



Método luz oscuridad de Reille:

A fin de poder diferenciar con la microscopia óptica los elementos estructurales que definen la arquitectura de la pared, se realiza la técnica Luz-Oscuridad (Reille, 1992). Dicha técnica consiste en buscar un punto concreto sobre el objetivo, cerrar a la mitad el diafragma de apertura y completamente el diafragma de campo. Mover el condensador hasta que el borde del diafragma de campo aparece neto de color entre el rojo y el azul. Abrir el diafragma de campo hasta hacer desaparecer los iris del campo de visión. Se regula el diafragma de apertura hasta obtener la mejor imagen posible. De esta manera, observando al microscopio moviendo el micrómetro cualquier elemento de relieve primero se ve claro y después oscuro (paredes de los muros de un retículo, gemas, estrías), por el contrario si se trata de un agujero se observa primero oscuro y después claro (lúmenes de un polen reticulado, perforaciones).

Figura 5. 8 Estructura y escultura de la exina



5.2.1.3. Cálculo de las concentraciones de granos de polen método Hirst

Se realiza conforme al procedimiento aprobado por la Red Española de Aerobiología, Manual de la REA 2007.

Los resultados que se obtienen de un captador Hirst son concentraciones medias diarias de granos de polen y esporas de hongos (pólenes/m³ y esporas/m³).

Para obtener estos valores basta realizar un simple cálculo matemático en el que intervienen como factores:

- El número de partículas contadas (N).
- La superficie de muestra analizada. Para calcularla se necesita conocer el número (K1) de líneas contadas, su longitud (K2) y anchura (K3)

(K3 depende del microscopio y del objetivo que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K4).

- El volumen de aire que aspira el captador, 10 L/min, que, al cabo de un día equivalen a 14,4 m³ de aire (K5 = V).

- Muchos de los parámetros se mantienen constantes (mientras no se cambie de microscopio u objetivo y se siga una rutina de contaje), de manera que es habitual tenerlos establecidos para que la operación de conversión de los datos brutos diarios a concentraciones medias diarias quede reducida a una simple multiplicación entre una constante y el número de partículas detectadas.

- La fórmula a aplicar es: Concentración media diaria = K x N, donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (K1 a K5).

Análisis al microscopio óptico

Aa = Área analizada:

$$\text{Área analizada} = K1 \cdot K2 \cdot K3 = 48\text{mm} \cdot 0,398\text{mm} \cdot 4 = 76,42\text{mm}^2 = 0.000076416\text{m}^2$$

- Líneas contadas = (K1 = 4).
- Longitud de la línea = (K2 = 48 mm)
- Anchura de la línea = (K3 = 0,398 mm)

- N = Número de granos de polen contados en área analizada por día

- V = K5 = Volumen de aire analizado por día = 14.4 m³

- $V = 10 \text{ L/min} \times (24\text{h} \times 60\text{min/h}) \times (1/1000 \text{ l})\text{m}^3 = 14,4 \text{ m}^3$

- **Am** = K4 = Área muestra = 48 mm x 14 mm = 672 mm² = 0.000672 m²

$$K = \frac{\frac{K4}{K1 \cdot K2 \cdot K3}}{V} = \frac{\frac{Am}{Aa}}{V} = \frac{8,7947}{14,4\text{m}^3} = \frac{0,61}{\text{m}^3}$$

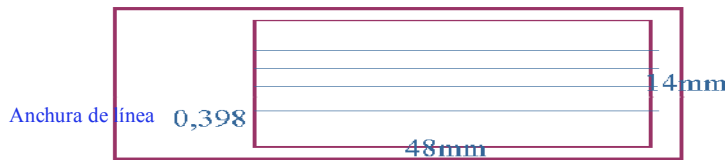
Concentración media diaria (Cmd):

$$Cmd = N \cdot K = N \cdot \frac{0,61}{m^3}$$

En la siguiente figura se representa un ejemplo gráfico para una anchura de lectura de 0,398 milímetros, en donde K toma el valor de 0,61

Figura 5. 9 Granos de polen por unidad de volumen (P/m³)

Granos de polen por unidad de volumen (P/m³)



5.2.1.4. Estación polínica: cálculo de los periodos principales de polinización de *Olea* años 2000-2007

Existen diferentes condiciones y criterios para definir y limitar la estación polínica. La curva anual de polen de un taxón determinado se representa como concentraciones medias diarias. En Aerobiología, frecuentemente, sólo se utilizan los datos del polen correspondientes al periodo anual donde se registra la mayoría del polen total acumulado. Dependiendo de ciertas condiciones o criterios en la literatura se define a este periodo como “*estación de polinización*” (Nilsson *et al*, 1981) “*Periodo de Polinización*” o “*Periodo Principal de Polinización (PPP)*” (Comtois, 1998) (Frenguelli *et al*, 2002) “*Estación Efectiva de Polen*” Giorato M. *Et al*, 2000 y “*Estación Atmosférica de Polen*” (Jato *et al*, 2002).

Los diferentes conceptos y definiciones usados en la literatura científica aerobiologica (Jato *et al*, 2002) sobre la estación polínica ya han sido definidos en el punto 4.2.4.5.2 de esta memoria.

Un método común para el cálculo de la estación polínica, es usar un porcentaje dado del total anual para calcular el comienzo y el fin de la estación principal de polen. Para el cálculo de la estación polínica de *Olea* hemos seleccionado el criterio más ampliamente utilizado en la literatura que es el de **PERIODO PRINCIPAL DE POLINIZACIÓN (PPP)**: Periodo de máxima producción de polen. Para su cálculo, en esta memoria se ha aplicado en principio el concepto de *Andersen y Torben (1991)*, es decir, desde el día en el cual la suma de concentraciones diarias de polen (porcentaje acumulado) alcanza, por término medio, el 2,5% de la suma total hasta cuando la suma alcanza 97,5%, o sea, el período con un 95% de la cantidad total de polen observado. A fin de eliminar colas al inicio y final del periodo de floración que incluyen un alto número de valores nulos, ya que son origen de floraciones extemporáneas o de resuspensión de granos de polen, hemos aplicado un nuevo método de cálculo, el **Método de Persson y Nilsson (1981)** modificado por *Jäger et al (1996)*, con el fin de definir mejor, y de forma más ajustada, el PPP de *Olea* a los índices polínicos atmosféricos

Interpretación de los Resultados. Categorías Polínicas.

La Red Española de Aerobiología propone una serie de categorías polínicas, considerando distintos umbrales, que posibilitan la clasificación de las concentraciones polínicas resultantes de los muestreos. Dichas categorías facilitan la expresión gráfica de los resultados en mapas sobre la situación actual y una posible previsión. De esta manera el usuario obtiene una mejor comprensión de la información generada. Con el establecimiento de las diferentes categorías polínicas se intenta homogeneizar la información aerobiológica en el territorio nacional, teniendo en cuenta los diferentes pisos bioclimáticos y unidades biogeográficas existentes.

Es de reseñar, sin embargo, que, en ocasiones, y para algunos tipos polínicos en particular, han de establecerse categorías y umbrales de concentración polínica a nivel local o regional teniendo en cuenta los numerosos factores que condicionan su presencia: abundancia de la especie en una zona

concreta, presencia de otras especies con las que puede establecer relación de reactividad cruzada, presencia de contaminantes atmosféricos, condiciones meteorológicas particulares, etc..., y que intervienen en la aparición de síntomas en las personas afectadas de polinosis.

En el establecimiento de los umbrales para definir las diferentes categorías se han tenido en cuenta:

- a) el carácter anemófilo/entomófilo de las distintas especies;
- b) el Índice Polínico Anual y
- c) la posible capacidad alergógena de las distintas especies.

De acuerdo a estos factores, se han establecido cuatro grupos que incluyen diferentes tipos polínicos. En cada uno de ellos, se han delimitado cuatro categorías: nulo, bajo, moderado o alto, que hacen referencia a umbrales de concentración de polen necesarios para que un porcentaje bajo, medio o alto de la población sensible desarrolle los síntomas asociados a la presencia de estos tipos polínicos.

En base a estos criterios los diferentes tipos polínicos se han repartido en 4 grupos con umbrales polínicos diferentes para cada categoría

Grupo 1:

granos /m ³	< 1	1 - 25	26 - 50	> 50
Categorías	Nulo	Bajo	Moderado	Alto

Tipos polínicos incluidos: Poaceae, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Plantago*, *Rumex*, *Artemisia*, *Ericaceae*, Asteraceae, *Helianthus*.

Grupo 2:

granos /m ³	< 1	1 - 30	31 - 50	> 50
Categorías	Nulo	Bajo	Moderado	Alto

Tipos polínicos incluidos: *Betula*, *Casuarina*, *Corylus*, *Castanea*, *Eucalyptus*, *Alnus*, *Acer*, *Populus*, *Ulmus*, *Ligustrum*.

Grupo 3:

granos /m ³	< 1	1 - 50	51-200	> 200
Categorías	Nulo	Bajo	Moderado	Alto

Tipos polínicos incluidos: *Olea*, *Cupressus*, *Platanus*, *Populus*, *Quercus*, *Pinus*.

Grupo 4:

granos /m ³	< 1	1 - 15	16 - 30	> 30
Categorías	Nulo	Bajo	Moderado	Alto

Tipos polínicos incluidos: *Parietaria*, *Urtica membranacea*, *Mercurialis*, *Echium*, *Fabaceae*, *Apiaceae*, *Cannabis*, *Brassicaceae*.

Cálculo del PPP***1. Método de Andersen y Torben (1991)***

Con el valor acumulado diario de granos de polen por m³ desde la aparición del primer grano de polen de *Olea* hasta el último en el año, se calcula el percentil 2,5 y el 97,5, que nos indican el día de comienzo del PPP (P 2,5) y el día de finalización del PPP (P 97,5) durante este periodo de tiempo en días se recoge el 95% del total del polen en la atmósfera

Principales características del período de polinización principal de Olea y otros tipos polínicos más representativos:

EP: Estación polínica.

PPP: Duración en días del período de polinización principal;

M/D: Concentración máxima y día en que se alcanza.

PT: Granos de polen totales durante el PPP.

N > 50: Número de días en que las concentraciones superan los 50 granos de polen/m³.

N > 100: Número de días en que las concentraciones superan los 100 granos de polen/m³

PTA: Polen total anual.

2. Método de Persson y Nilsson (1981) modificado por Jäger et al, (1996)

PPP método **Persson y Nilsson (1981)**: período en días que abarca desde el momento en que la suma de los valores medios diarios de la concentración de polen alcanza el 5% del total anual, hasta que su suma llegue al 95% del total de granos de polen, es decir, la estación polínica comprenderá el período de tiempo en que se recoge el 90% del total anual de granos de polen.

P inicio fecha **Jäger et al, (1996)**: la estación Polen comienza el primer día que se alcanza una concentración mayor del 1% del polen anual, sin que se produzcan más de 6 días con valor 0 cero.

P final fecha: **Jäger et al, 1996**. Se fija como fecha de finalización del PPP cuando se alcanza el 95% del polen anual total

A continuación se adjuntan los modelos de las plantillas usadas para la recogida de datos del PPP de *Olea* según los diferentes métodos de cálculo utilizados; así como el cálculo de días del PPP de *Olea* año a año que se incluyen en las diferentes categorías de índices polínicos $n=0$; $n>0<10$; $n>10<50$; $n>50<100$; $n>100$; $n>200$ y $n>500$ para definir los valores umbrales de *Olea* en nuestra atmósfera

Datos presencia Olea atmosfera Cartagena (Murcia) 2000-2007

Andersen yTorben (1991)

Datos del Periodo Principal de Polinización

Año	P inicio fecha	P final fecha	PPP días	Día pico	Valor pico (Granos/m ³ y día)

Niveles de valores de Olea

Año	Polen total	Polen total <i>Olea</i>	% Polen <i>Olea</i>	N=0	0<N<10	10<N<50	50<N<100	N>100	N>200	N>500

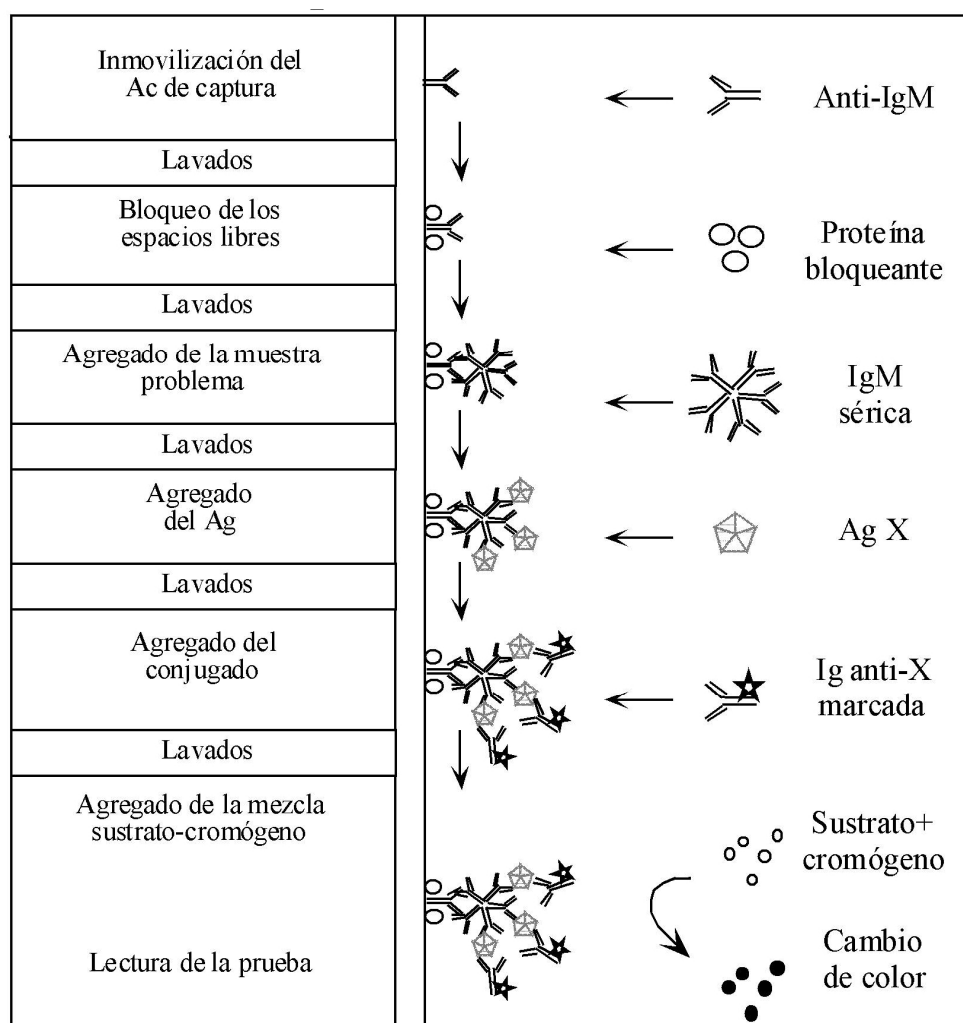
5.2.2. Cuantificación de los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2 del polen de olivo

Para la cuantificación de los alérgenos del polen de olivo se ha utilizado la técnica ELISA Doble Fase, más conocida como ELISA doble Sandwich por quedar el antígeno atrapado entre dos anticuerpos, haciendo una extracción previa de las muestras mediante el método descrito en el apartado siguiente.

Técnica ELISA doble sandwich

Figura 5. 10 Esquema técnica ELISA Sándwich

<http://www.vet.unicen.edu.ar>
Facultad de ciencias veterinarias. 2008



5.2.2.1.1. Extracción de los alérgenos de las muestras. Protocolo

Las muestras recogidas en viales Eppendorf de 1,5 mL, procedentes del captador ciclón Burkard, se extrajeron utilizando el método descrito por Takahashi *et al*, con ligeras modificaciones (Takahashi *et al*, 2001):

- a) Descongelación de la muestra a temperatura ambiente.
- b) Resuspensión de la muestra en 120 µl de tampón de extracción (50 mM tampón fosfato pH 7,4; 150 mM NaCl; 125 mM bicarbonato amónico; 3 mM EDTA; 0,005% tween 20).
- c) Extracción durante 2 horas a temperatura ambiente.
- d) Centrifugación a 4000 rpm durante 10 min.
- e) Separación del sobrenadante y del precipitado, y guardar ambos a -20°C.

5.2.2.1.2. Purificación de alérgenos Ole e 1 y Ole e 2

El polen de olivo fue suministrado por “Polen Mediterráneo” (Jaén), Biopol (Barcelona), New England Antigens (Portland, ME), y Allergon (Engelholm, Sweden). Los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2 naturales se purificaron a partir de extractos de polen de olivo, previamente descongelados, mediante filtración en gel Sephadex G-75 (Pharmacia) equilibrado en bicarbonato amónico 0,2 M, pH 8,0. Las fracciones que contenían un mismo alérgeno se juntaron, liofilizaron y se aplicaron en una cromatografía de alta resolución en fase reversa, empleándose como sistema de elución un gradiente lineal (0-60%) de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (Villalba *et al*, 1990). El contenido en proteínas se midió siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976)

Para las rectas patrón se prepararon las siguientes concentraciones:

- ✓ Concentración de alérgeno: 100–50–25–10–5–2,5–1,0–0,5 ng/mL.

5.2.2.1.3. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales

Mediante inmunización de ratones BALB/c con Ole e 1 u Ole e 2 purificados se obtienen células de bazo que se fusionan con células SP₂O de mieloma en presencia de polietilén glicol. Los hibridomas positivos se identificaron mediante ELISA con placas revestidas del alérgeno natural correspondiente con posterior subclonación por dilución limitante.

Se consiguieron varios anticuerpos monoclonales con especificidad para Ole e 1 u Ole e 2. De los anticuerpos, solamente los más reactivos (5A3 para Ole e 1, y 5F2 y 3H8 para Ole e 1) y suero de conejo policlonal se purificaron y etiquetaron con biotina (Arilla *et al*, 2002).

El suero policlonal se obtuvo mediante inmunización de conejos Nueva Zelanda con Ole e 1 u Ole e 2. Para la obtención de los anticuerpos, el sobrenadante del cultivo de hibridomas o el suero de conejo anti-alérgeno se purificó mediante cromatografía de afinidad con Sefarosa-proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). La inmunoglobulina G de conejo purificada se marcó con biotina usando el kit de biotinilación proteica enzimática quimioluminiscente (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). La detección de isotipos se hizo con el kit IsoStrip (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), de acuerdo al manual de instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos se prepararon a partir de las siguientes concentraciones:

✓ *Anticuerpos de captura*

Anti-Ole e 1: mAb 5A3 (5 mg/mL) en PBS

Anti-Ole e 2: mAb 5F2 y 3H8 (2,5 mg/mL) en PBS

✓ *Anticuerpos biotinados*

Anti-Ole e 1: anticuerpo policlonal (0, 25 µg/mL) en PBS-T-B

Anti-Ole e 2: anticuerpo policlonal (1 mg/mL) en PBS-T-B

5.2.2.1.4. Elisa doble fase. Protocolo

1. Descongelación de los extractos problema.
2. Se tapizan placas de ELISA (Greiner, Frickenhausen, Germany) añadiendo 100 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal correspondiente diluido (2,5 µg/mL) en tampón PBS y se incuba toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.
3. Se vacía el contenido de las placas para posteriormente añadir 200 µl/pocillo de tampón PBS-BSA al 1% y tween 20 al 0,05% (PBS-B-T), e incubar 1 h a 37°C.
4. Se añaden 100 µl/pocillo del patrón o de los extractos problema (dilución 1/100) en PBS-B-T, y se incuba 1 hora a 37°C.
5. Se lava 3 veces con 200 µl de PBS-TWEEN 20 0,05% (PBS-T).
6. Se añaden 100 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal o policlonal marcado con biotina correspondiente diluido (2,5 µg/mL) en PBS-B-T, e incubar 1 hora a 37°C.
7. Lavado 3 veces con 200 µl de PBS-T.
8. Se añaden 100 µl/pocillo de estreptavidina conjugada a peroxidasa (250 ng/mL en PBS-B-T) (Sigma, s-5512), y se incuba 1 hora a 37 °C.
9. Lavado 3 veces con 200 µl de PBS-T.
10. Se Añaden 200 µl/pocillo de la solución de o-fenilendiamina (Sigma-fasttm o-phenylendiamine dihydrochloride tablet sets, Sigma p-9187) y se mantienen las placas en oscuridad 30 minutos.
11. Se para la reacción con 50 µl/pocillo de 3M H₂SO₄.
12. Medir absorbancia a 492 nm.
13. Representar absorbancia vs log de la concentración (ng/mL), e interpolar en la parte lineal de la curva estándar.

5.3. Tratamiento estadístico de los datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se ha utilizado el paquete informático SPSS versión 17 para Windows Xp. SPSS Ibérica, an IBM Company Plaza de Colón 2 – Torre de Colón 2 – Torre II Planta 16. 28046 Madrid.

6. RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Datos aerobiológicos de *Olea europaea* en la atmósfera de Cartagena (Murcia) en el periodo 2000-2007.

En este apartado se van a presentar los resultados de los recuentos aerobiológicos efectuados en la ciudad de Cartagena desde el inicio del año 2000 hasta la finalización del 2007. En primer lugar los datos anuales de *Olea* y los recuentos anuales totales, a continuación se presentarán los resultados de la evolución anual, y las precipitaciones recogidas en la ciudad. Seguidamente, se presentan los cálculos del Periodo Principal de Polinización y el estudio de la representatividad de *Olea* en el espectro polínico de la ciudad de Cartagena. En el apartado 6.1.5 se recogen los datos relativos a la presencia de otros taxones importantes desde el punto de vista aerobiológico cuya floración coincide en el Periodo Principal de Polinización de *Olea*.

6.1.1. Evolución de *Olea* durante el periodo de estudio años 2000-2007

En la tabla 6.1 se presentan los valores acumulados anuales de *Olea*, junto con los valores acumulados de los granos de polen total y la lluvia anual acumulada. En la columna de la derecha aparece el porcentaje que representa el taxón *Olea* frente a los recuentos totales. La figura 6.1 muestra estos datos de un modo gráfico.

6.1.2. Variación anual de *Olea* y lluvias durante el periodo de estudio.

En las figuras 6.2 a 6.9 se representan las concentraciones del taxón *Olea* y las precipitaciones registradas para cada uno de los años del periodo de estudio.

6.1.3. Caracterización del Periodo Principal de polinización de *Olea* durante el periodo de estudio años 2000-2007.

En la tabla 6.2 se detallan los datos aerobiológicos que definen el Periodo Principal de Polinización de *Olea* según el método descrito por Andersen y Torben (1991) para cada año en estudio.

Tabla 6. 1 Tablas valores acumulados anuales de *Olea*, Pólenes totales y lluvias durante los años 2000-2007. Porcentaje de representación de *Olea* frente al polen total.

año	<i>Olea</i> granos/m³ y año	Polen Total granos/m³ y año	Lluvia mm/año	% <i>Olea</i> frente al Polen total
2000	730	5777	343,40	12,64
2001	1474	5959	225,10	24,74
2002	1605	13952	159,00	11,50
2003	2276	15152	404,50	15,02
2004	1385	12254	250,00	11,30
2005	700	5916	224,70	11,83
2006	2461	17682	223,50	13,92
2007	2476	21517	371,30	11,51
Media del periodo				13,35
Media del periodo sin el año 2005				13,44

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

Figura 6. 1 Variación interanual de *Olea*. Polen total (granos/m³ y día) y lluvia (mm) durante el periodo 2000-2007.

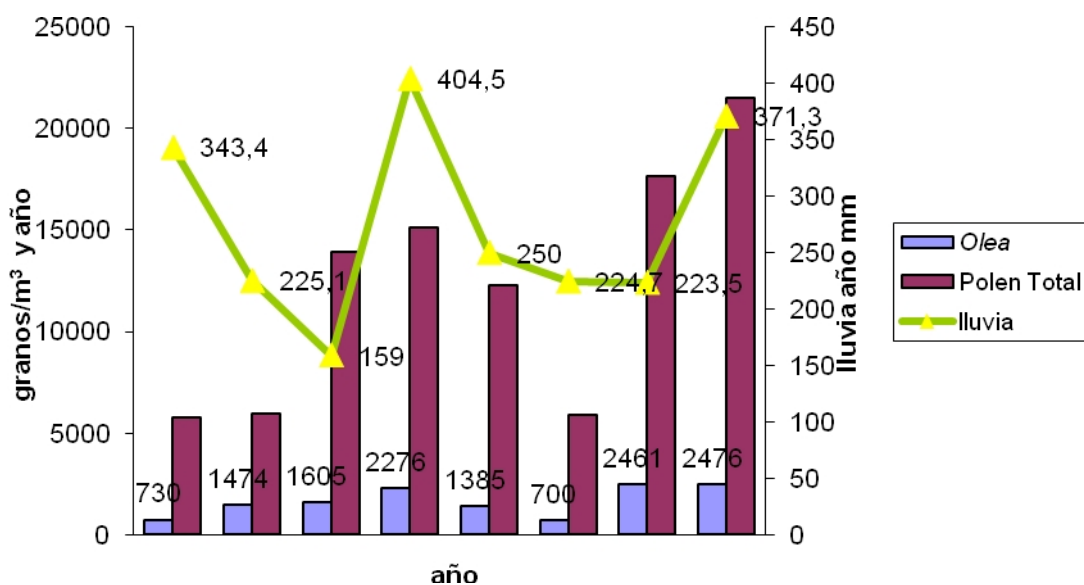


Figura 6. 2 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2000

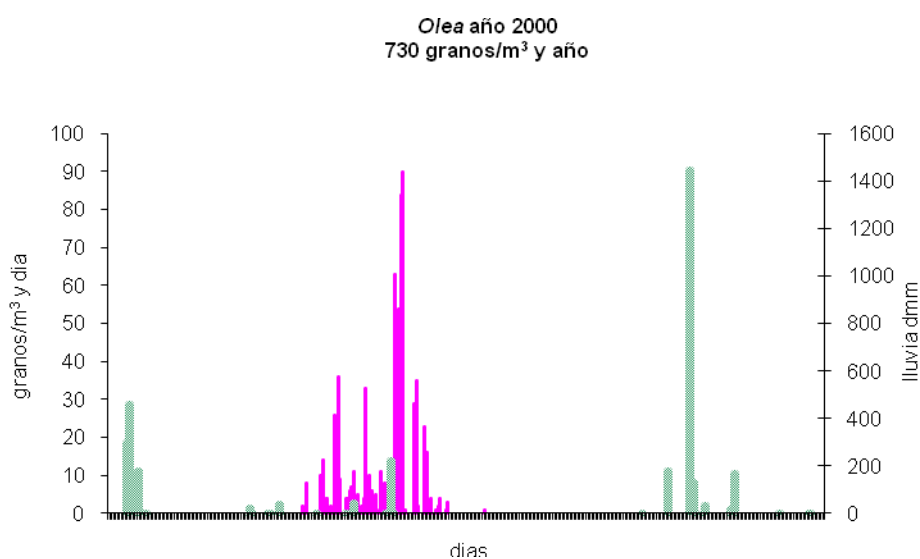


Figura 6. 3 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución 2001

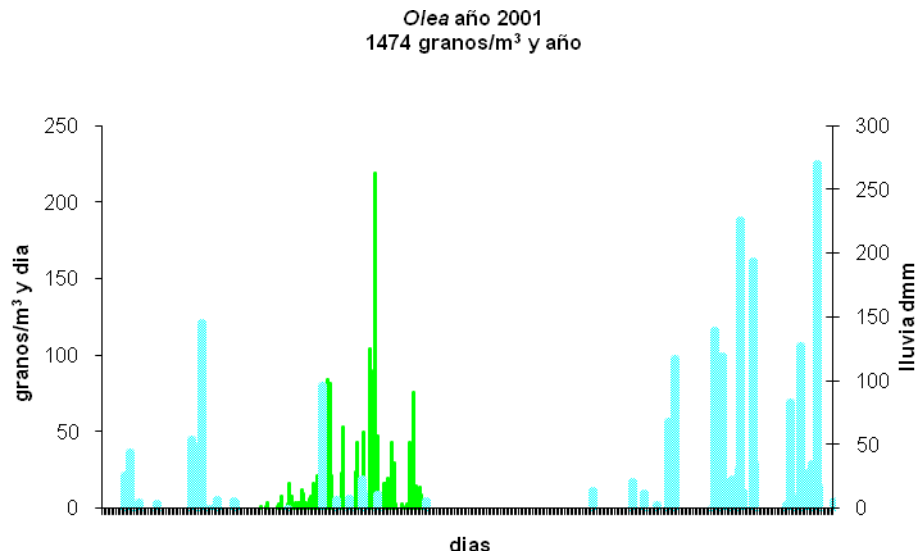


Figura 6. 4 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2002

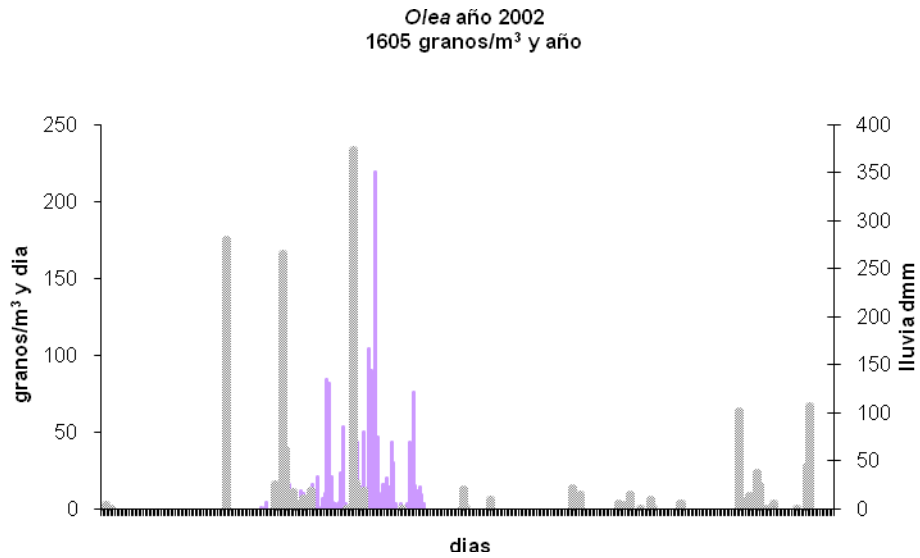


Figura 6. 5 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2003.

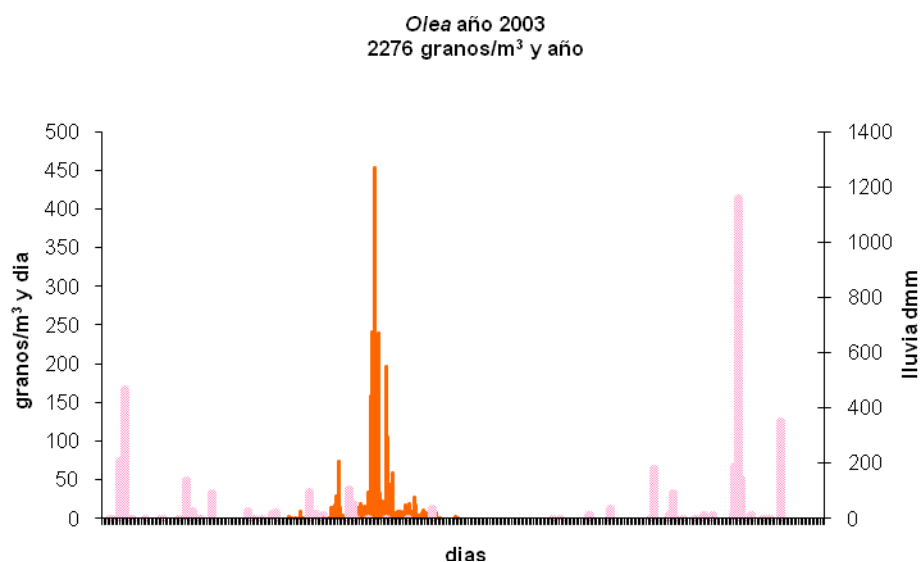


Figura 6. 6 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2004.

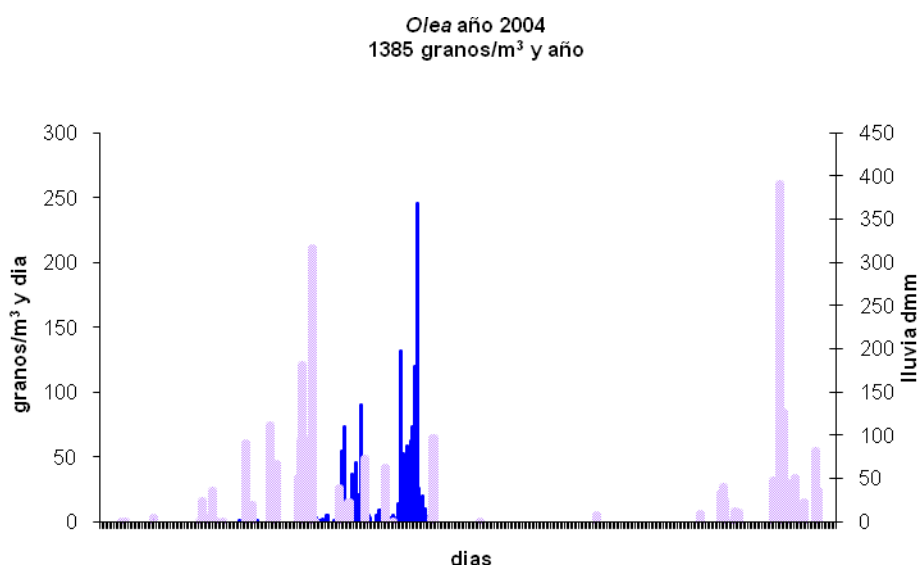


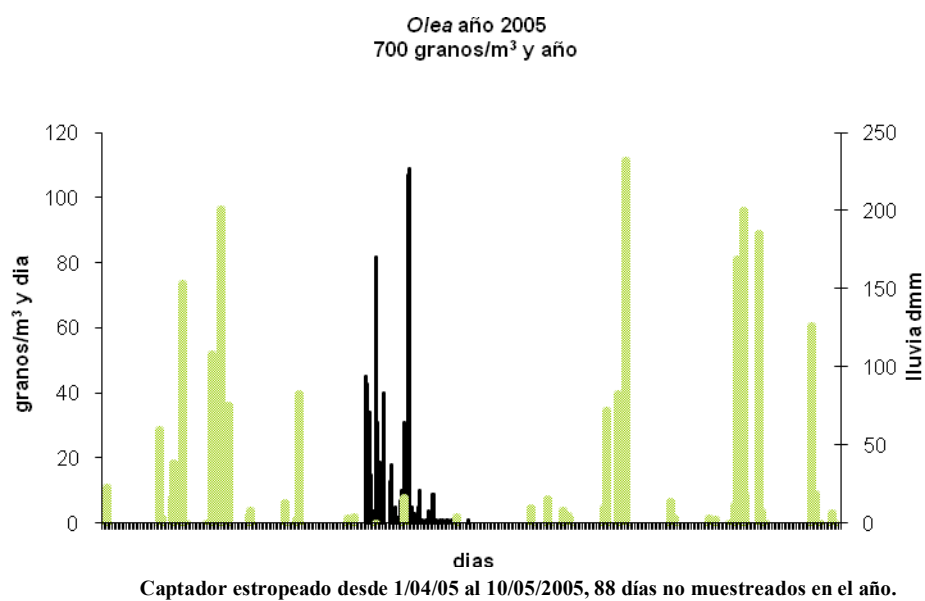
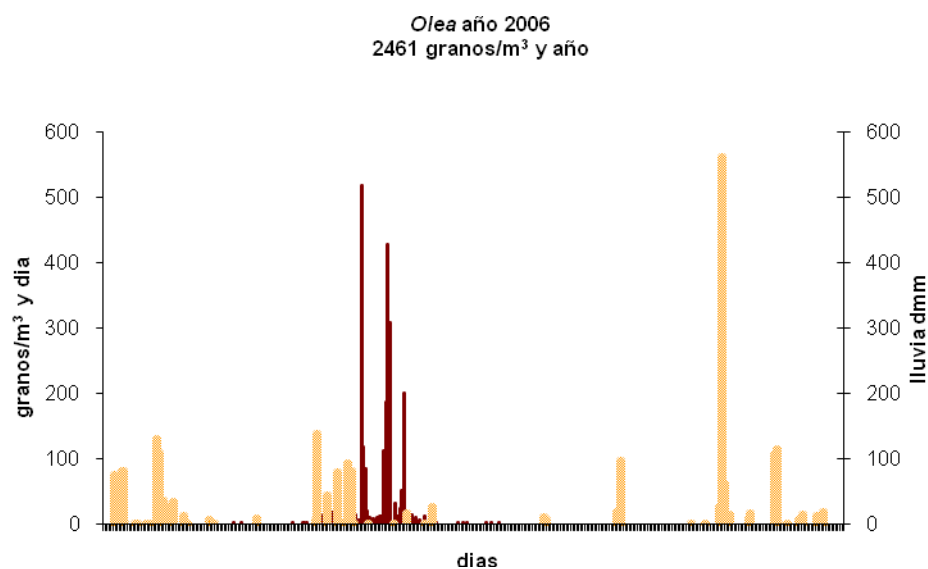
Figura 6. 7 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2005.**Figura 6. 8** Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2006.

Figura 6. 9 Concentraciones de *Olea* y precipitaciones. Evolución año 2007.

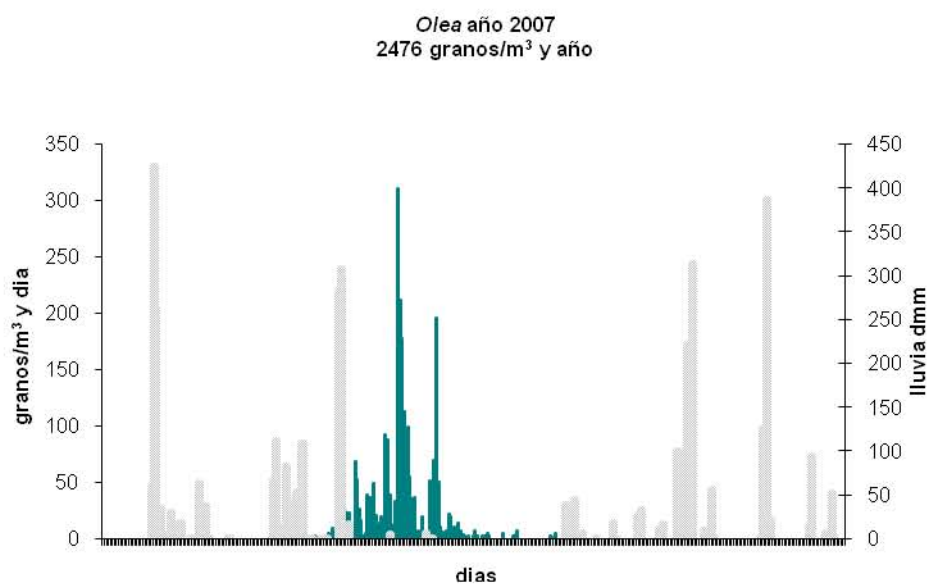


Tabla 6. 2 Datos del Periodo Principal de Polinización de *Olea* (PPP¹) 2000-2007 calculados en base al método Andersen y Torben (1991)

Año	Fecha inicio PPP ²	Fecha fin PPP ³	Duración PPP días	Fecha día pico ⁴	Valor pico ⁵ granos/m ³ y día
2000	11/04/2000	20/06/2000	70	30/05/2000	90
2001	24/03/2001	08/06/2001	76	17/05/2001	219
2002	20/04/2002	18/06/2002	60	18/05/2002	129
2003	11/04/2003	20/06/2003	71	18/05/2003	453
2004	24/03/2004	11/06/2004	79	06/06/2004	246
2005	11/05/2005	23/06/2005	44	23/06/2005	109
2006	04/04/2006	11/06/2006	75	08/05/2006	518
2007	09/04/2007	24/07/2007	106	26/05/2007	311

*Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

¹**PPP Andersen y Torben (1991).**: período en días que abarca desde el momento en que la suma de los valores medios diarios de la concentración de polen alcanza el 2,5% del total anual, hasta que su suma llegue al 97,5% del total de granos de polen, es decir, el número de días en que se recoge el 95% del total anual de granos de polen.

²**Fecha inicio PPP:** Día del año con el valor acumulado diario de granos de polen por m³, desde la aparición del primer grano de polen hasta el último en el año, que se corresponde al percentil 2,5.

³**Fecha finalización del PPP:** día del año con el valor acumulado diario de granos de polen por m³, desde la aparición del primer grano de polen hasta el último en el año, que se corresponde al percentil 97,5.

⁴**Día Pico:** Fecha del día dentro del PPP en el que se alcanza el valor máximo de concentración de polen *Olea* en la atmósfera.

⁵**Valor Pico:** n° de granos/m³ y día de *Olea* del día pico

Tabla 6. 3 Resultados del cálculo del Periodo Principal de Polinización (PPP¹) de *Olea* en base al método de *Persson y Nilsson (1981)* combinado con el de *Jäger et al, (1996)*.

Año	Duración PPP días	Fecha inicio PPP ²	Fecha fin PPP ³
2000	55	21/04/2000	11/06/2000
2001	73	24/03/2001	04/06/2001
2002	50	23/04/2002	12/06/2002
2003	58	14/04/2003	11/06/2003
2004	62	06/04/2004	07/06/2004
2005	37	14/05/2005	20/06/2005
2006	61	21/04/2006	09/06/2006
2007	75	20/04/2007	04/07/2007

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

¹**PPP** método *Persson y Nilsson (1981)*: período en días que abarca desde el momento en que la suma de los valores medios diarios de la concentración de polen alcanza el 5% del total anual, hasta que su suma llegue al 95% del total de granos de polen, es decir, la estación polínica comprenderá el período de tiempo en que se recoge el 90% del total anual de granos de polen.

²**Fecha inicio PPP** *Jäger et al, (1996)*: la estación Polen comienza el primer día que se alcanza una concentración mayor del 1% del polen anual, sin que se produzcan más de 6 días con valor 0 cero.

³**Fecha finalización del PPP** *Jäger et al, (1996)*: día del año con el valor acumulado diario de granos de polen por m³ desde la aparición del primer grano de polen hasta el último en el año, que se corresponde al percentil 95.

6.1.4. Niveles umbrales para el tipo polínico *Olea* en el bioaerosol de Cartagena. Valores anuales y durante el Periodo Principal de Polinización. Representatividad del taxón en el espectro polínico de la Ciudad.

En las tablas 6.4 a 6.6 se presentan los niveles umbrales para el tipo polínico *Olea*, según los criterios propuestos por la Red Española de Aerobiología (Tabla 6.4), en base a criterios estadísticos, percentiles 90, 95 y 99 (Tabla 6.5) y tras el análisis del Periodo Principal de Polinización (Tabla 6.6).

La tabla 6.7 recoge el número de días en los que se registran los niveles polínicos que se indican dentro del Periodo Principal de Polinización. La tabla 6.8 agrupa los días que se registran menos de 50 granos de polen/m³ y los días de más de 50 granos de polen/m³ o con más de 100 granos de polen/m³. La tabla 6.9 recoge los valores de la tabla 6.7 expresados como porcentaje.

En la tabla 6.10 se presenta para el Periodo Principal de Polinización de *Olea* las cantidades registradas de este taxón y el total acumulado, así como el porcentaje que *Olea* representa frente al total en estos periodos. La figura 6.10 muestra en forma de diagrama de barras el número de días del Periodo Principal de Polinización de *Olea*, el número de días que los valores están por debajo y por encima de 50 granos de polen/m³, los datos numéricos pueden verse en la tabla 6.8.

Tabla 6. 4 Niveles umbrales de *Olea* propuestos por la REA

	<i>Nulo</i>	<i>Bajo</i>	<i>Moderado</i>	<i>Alto</i>
<i>Olea</i>	<1 granos/m ³	1-50 granos/m ³	51-200 granos/m ³	>200 granos/m ³

Tabla 6. 5 Niveles umbrales de *Olea* para Cartagena, calculados en base a Criterios estadísticos: percentiles 90, 95 y 99 durante el periodo en estudio 2000-2007

	<i>Bajo</i>	<i>Medio</i>	<i>Alto</i>	<i>Muy alto</i>
<i>Olea</i>	<53 granos/m ³	53-99 granos/m ³	100-243 granos/m ³	>243 granos/m ³

Tabla 6. 6 Valores umbrales *Olea* en granos/m³ para Cartagena tras su análisis PPP

	<i>Bajo</i>	<i>Medio</i>	<i>Alto</i>	<i>Muy alto</i>
<i>Olea</i>	<10 granos/m ³	10-50 granos/m ³	51-100 granos/m ³	>100 granos/m ³

Tabla 6. 7 Concentración acumulada anual de *Olea* y número de días en los que las concentraciones de *Olea* se encuentran en los rangos que se indican dentro del PPP.

año	Total Anual <i>Olea</i>	N=0	0<N≤10	10<N≤50	50<N≤100	100<N≤200	200<N≤500	N>500	Total
	granos/m ³	días							
2000	730	15	37	14	4	0	0	0	70
2001	1474	12	31	25	5	2	1	0	76
2002	1605	5	23	21	6	5	0	0	60
2003	2277	3	32	27	3	3	3	0	71
2004	1385	29	28	12	7	2	1	0	79
2005	700	7	21	13	1	2	0	0	44
2006	2461	20	27	19	2	3	3	1	75
2007	2476	20	47	24	10	3	2	0	106

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

Tabla 6. 8 Número de días en los que los niveles del taxón *Olea* se encuentra por debajo de 50 granos/m³, por encima de este valor o por encima de 100 granos/m³.

año	PPP	< 50	> 50	> 100
		granos/m ³		
		días		
2000	70	66	4	0
2001	76	68	8	3
2002	60	49	11	5
2003	71	62	9	6
2004	79	69	10	3
2005	44	40	4	2
2006	75	66	9	7
2007	106	91	15	5

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005,
88 días no muestreados en el año.

Tabla 6. 9 Porcentaje que representan los días en los que las concentraciones se encuentran en los rangos que se indican dentro del PPP de *Olea*.

Año	N=0	0<N≤10	10<N≤50	50<N≤100	100<N≤200	200<N≤500	N>500
	%						
2000	21,4	52,9	20,0	5,7	0,0	0,0	0,0
2001	15,8	40,8	32,9	6,6	2,6	1,3	0,0
2002	8,3	38,3	35,0	10,0	8,3	0,0	0,0
2003	4,2	45,1	38,0	4,2	4,2	4,2	0,0
2004	36,7	35,4	15,2	8,9	2,5	1,3	0,0
2005	15,9	47,7	29,5	2,3	4,5	0,0	0,0
2006	26,7	36,0	25,3	2,7	4,0	4,0	1,3
2007	18,9	44,3	22,6	9,4	2,8	1,9	0,0

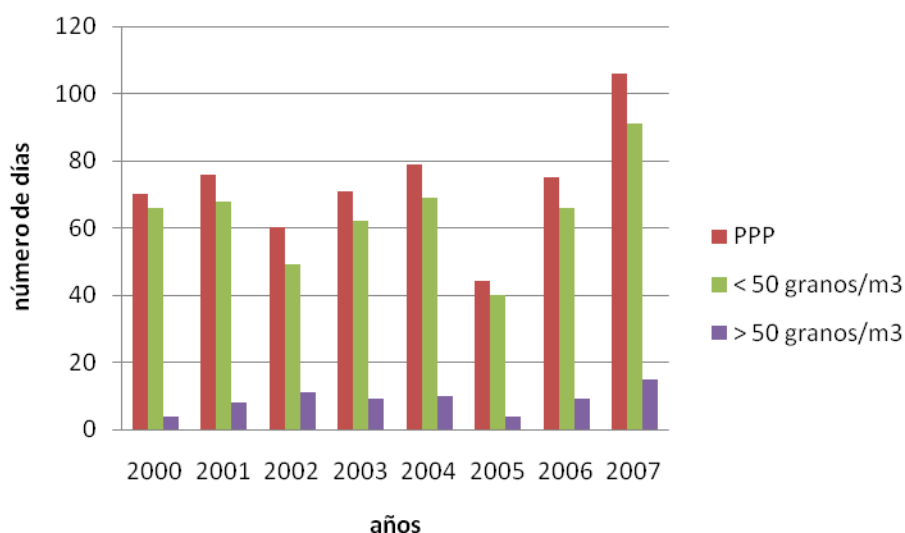
Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

Tabla 6. 10 Representación del taxón *Olea* frente al polen total en el Periodo Principal de Polinización. En la tabla se presenta para cada año la duración en días del PPP, y para ese periodo la cantidad acumulada de *Olea* y el total acumulado.

Año	Periodo Principal de Polinización de <i>Olea</i>			
	días	<i>Olea</i> granos/m ³	Polen total granos/m ³	% <i>Olea</i> frente al total
2000	70	708	2507	28,24
2001	76	1460	3595	40,61
2002	60	1605	7592	21,14
2003	71	2267	8877	25,54
2004	79	1374	6991	19,65
2005	44	699	2145	32,59
2006	75	2438	9272	26,29
2007	106	2467	10154	24,30
Media del periodo				25,46
Media del periodo sin el año 2005				25,15

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

Figura 6. 10 Número de días del Periodo Principal de Polinización. Días con > de 50 y con < de 50 granos de *Olea*/m³ desde 2000 a 2007.



6.1.5. Presencia de otros taxones influyentes durante el Periodo Principal de Polinización de *Olea*: Evaluación de reactividad cruzada.

En la tabla 6.11 se recogen las concentraciones anuales de *Olea* y de los taxones representativos que se encuentran en la atmósfera de Cartagena durante su Periodo Principal de Polinización, *Chenopodiaceae*-*Amaranthaceae*, *Palmae*, *Platanus*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex*, *Urticaceae* y *Zygophyllum*, así como las concentraciones acumuladas de los mismos en este periodo. La tabla 6.12 recoge los valores acumulados de los recuentos de *Olea* y de los taxones más representativos durante su PPP para el periodo total estudiado, 2000 a 2007 y el porcentaje que cada uno representa frente al total acumulado del periodo.

Tabla 6. 11 Concentración acumulada de *Olea* y los taxones más representativos en su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum* (granos/m³) en los años completos o durante el PPP.

año	fecha inicio	fecha final	PPP días	<i>Olea</i>	Chen	Palm	Pla	Poac	Quer	Rume	Urti	Zygo	Total año
2000	Completo			730	625	93	109	561	402	43	1211	183	5777
	18/04/2000	14/06/2000	70	708	202	68	38	467	271	36	472	155	2507
2001	Completo			1474	602	84	66	332	589	38	703	108	5959
	24/03/2001	08/06/2001	76	1460	210	69	50	291	587	37	435	83	3595
2002	Completo			1605	3238	170	293	1417	1772	109	1714	309	13952
	20/04/2002	18/06/2002	60	1605	655	145	214	1328	1706	102	1120	246	7592
2003	Completo			2276	2546	707	213	1167	1157	119	2169	482	15152
	11/04/2003	20/06/2003	71	2267	792	707	137	1111	1022	95	1564	423	8877
2004	Completo			1385	3094	215	450	971	702	127	2262	152	12254
	24/03/2004	11/06/2004	79	1374	660	208	401	876	682	108	1766	143	6991
2005	Completo			700	2003	66	36	212	336	19	439	143	5916
	11/05/2005	23/06/2005	44	699	130	52	19	179	336	17	218	123	2145
2006	Completo			2461	3872	545	327	1262	1063	108	2644	422	17682
	04/04/2006	11/06/2006	75	2438	719	467	272	1118	1037	195	1812	364	9272
2007	Completo			2476	5911	465	484	1395	1337	136	1693	289	21517
	09/04/2007	24/07/2007	106	2467	942	344	368	1286	1288	127	1112	274	10154

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

Tabla 6. 12 Concentraciones totales y representación porcentual de *Olea* y los taxones más representativos en su PPP, *Chenopodiaceae-Amaranthaceae*, *Palmae*, *Platanus*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex*, *Urticaceae* y *Zygophyllum*, para los datos completos del periodo y para los datos registrados durante el PPP de *Olea*.

2000 a 2007	<i>Olea</i>	Chen	Palm	Plan	Poac	Quer	Rume	Urti	Zygo
granos/m ³ totales	13107	21891	2345	1978	7317	7358	699	12835	2088
% en el total	13,35	22,29	2,39	2,01	7,45	7,49	0,71	13,07	2,13
granos/m ³ PPP	13018	4310	2060	1499	6656	6929	717	8499	1811
% en el PPP	25,46	8,55	4,03	2,93	13,02	13,55	1,23	16,62	3,54

Con el fin de mejorar la interpretación de los resultados recogidos, en la figura 6.11 se ha incluido un código de color, en el que se presentan en amarillo aquellos taxones que comparten plentamente el PPP, en azul aquellos que tienen más de un PPP, uno de ellos coincidente con *Olea*, pero el más importante en otro momento del año. En magenta se han coloreado los taxones que presentan un PPP extenso a lo largo del año teniendo una importante representación en el PPP de *Olea* (figura 6.10). En cuanto a la representación de *Olea* y el resto de los taxones representativos en su PPP, para el conjunto de los datos suponen el 52,07% de los gramos de polen presentes en la atmósfera de Cartagena en el periodo estudiado y año a año suponen: para el año 2000 el 43,40%; para 2001 el 60,33%; para 2002 el 54,42%; para 2003 el 58,59%; para 2004 el 57,05; para 2005 el 36,26%; para 2006 el 52,44% y para 2007 el 47,19%.

La tabla 6.13 recoge los taxones presentes en la atmósfera de Cartagena con más de un periodo de polinización.

Figura 6. 11 Código de color que representa los taxones que comparten el PPP con *Olea*, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

En amarillo los que lo comparten plenamente, en azul aquellos cuyos mayores niveles se encuentran fuera del PPP de *Olea*, en magenta, los que coincidiendo sus valores más altos con parte del PPP de *Olea*, presentan valores importantes fuera de ese periodo.

año	fecha inicio	fecha final	PPP días	<i>Olea</i>	Chen	Palm	Pla	Poac	Quer	Rume	Urti	Zygo
2000	Completo			730	625	93	109	561	402	43	1211	183
	18/04/2000	14/06/2000	70	708	202	68	38	467	271	36	472	155
2001	Completo			1474	602	84	66	332	589	38	703	108
	24/03/2001	08/06/2001	76	1460	210	69	50	291	587	37	435	83
2002	Completo			1605	3238	170	293	1417	1772	109	1714	309
	20/04/2002	18/06/2002	60	1605	655	145	214	1328	1706	102	1120	246
2003	Completo			2276	2546	707	213	1167	1157	119	2169	482
	11/04/2003	20/06/2003	71	2267	792	707	137	1111	1022	95	1564	423
2004	Completo			1385	3094	215	450	971	702	127	2262	152
	24/03/2004	11/06/2004	79	1374	660	208	401	876	682	108	1766	143
2005	Completo			700	2003	66	36	212	336	19	439	143
	11/05/2005	23/06/2005	44	699	130	52	19	179	336	17	218	123
2006	Completo			2461	3872	545	327	1262	1063	108	2644	422
	04/04/2006	11/06/2006	75	2438	719	467	272	1118	1037	195	1812	364
2007	Completo			2476	5911	465	484	1395	1337	136	1693	289
	09/04/2007	24/07/2007	106	2467	942	344	368	1286	1288	127	1112	274

Captador estropeado desde 1/04/05 al 10/05/2005, 88 días no muestreados en el año.

Tabla 6. 13 Taxones presentes en la atmósfera de Cartagena que tienen más de un Periodo de Polinización.

<i>Taxón</i>	<i>1º periodo floración</i>	<i>2º periodo floración</i>	<i>3º periodo floración</i>
Chenopodiaceae- Amaranthaceae,	Primavera	Otoño *	
<i>Cupressus</i>	Otoño **	Invierno *	Primavera
<i>Pinus</i>	Pre-primaveral *	Primaveral ****	
Urticaceae	Invierno	Primavera *	Otoño
<i>Artemisia</i>	Otoño	Invierno ***	

* Periodo principal

** Floración Sabina Mora o *Tetraclinis**** Floración *Artemisia barrilieri***** *Pinus pinea* y otras especies diferentes al *Pinus halepensis*

En las figuras 6.12 a 6.19 se representan los valores totales acumulados de *Olea* y el resto de los taxones que pueden tener importancia en los fenómenos de reactividad cruzada o sinergia alérgica, para cada uno de los años del estudio, especificando en cada una de ellas el orden de representación en cada uno de los años.

De acuerdo con el criterio estadístico, de modo análogo al utilizado con los datos presentados en la tabla 6.5, se han calculado para el resto de los taxones importantes durante el PPP de *Olea* los percentiles 90, 95 y 99. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.14. En la tabla 6.15 se recoge la clasificación de los niveles umbrales que resulta de la aplicación de estos criterios. En la tabla 6.16 se presentan los resultados de las correlaciones bivariadas de Pearson entre *Olea* y el resto de taxones importantes en su Periodo Principal de Polinización, para los recuentos obtenidos en ese periodo. En la tabla 6.17 se recogen los resultados del mismo análisis pero con los recuentos correspondientes a los años completos.

Figura 6. 12 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2000, Chenopodiaceae-*Amaranthaceae*, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Olea>Urti>Poa>Quer>Chen>Zygo>Palm>Plan>Rume

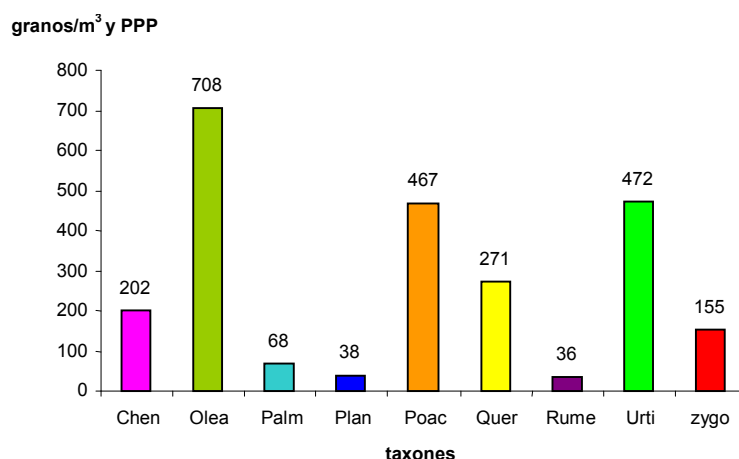


Figura 6. 13 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2001, Chenopodiaceae-*Amaranthaceae*, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Olea> Quer>Urti>Poa> Chen>Zygo>Palm>Plan>Rume

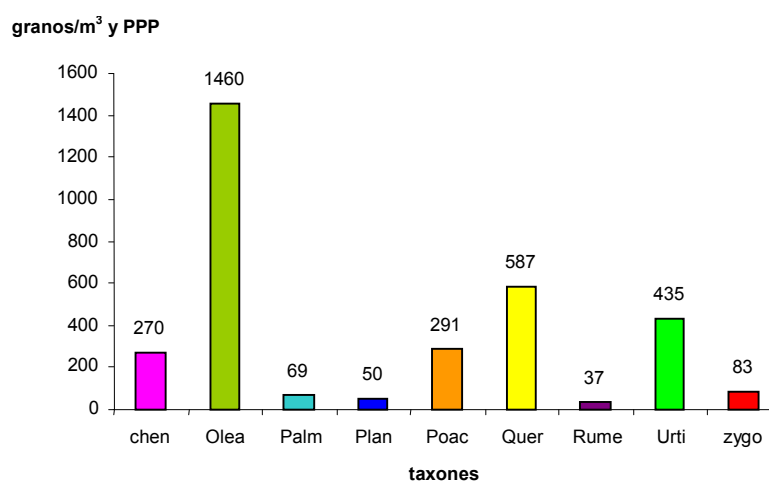


Figura 6. 14 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2002, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Quer>*Olea*> Poa> Urti> Chen>Zygo> Plan>Palm> Rume

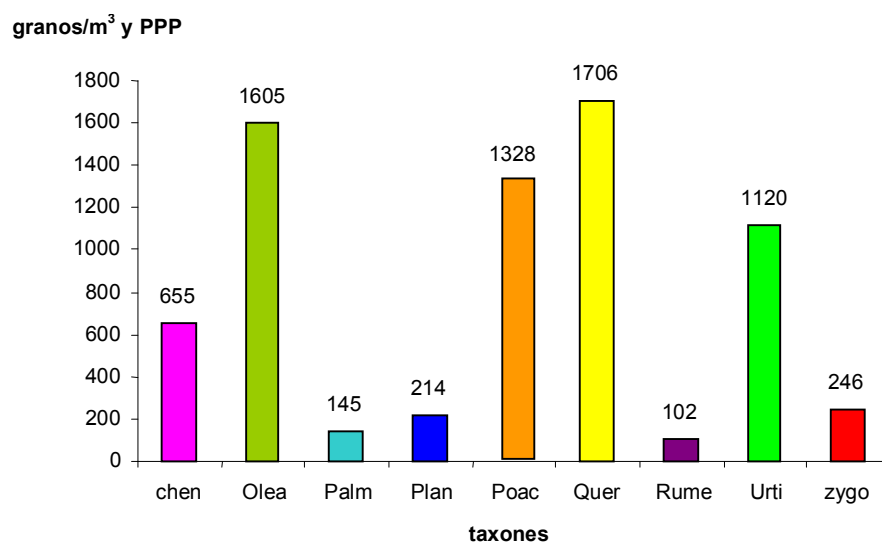


Figura 6. 15 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2003, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Olea> Urti>Poa> Quer> Chen> Palm> Zygo>Plan>Rume

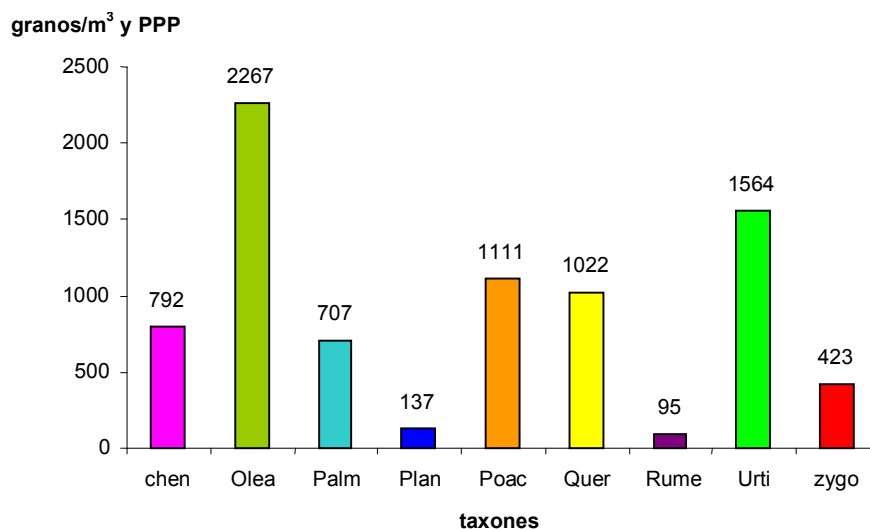


Figura 6. 16 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2004, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Urti> *Olea*>Poa> Quer> Chen> Plan> Palm> Zygo> Rume

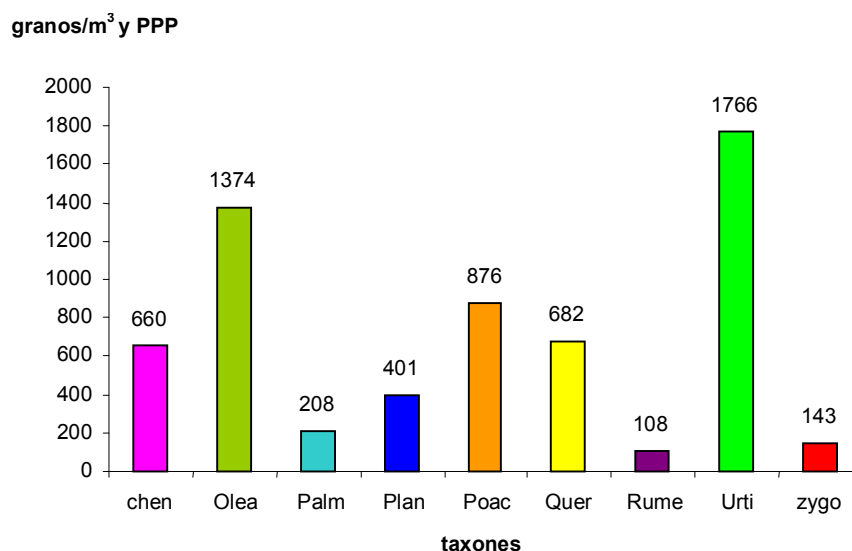


Figura 6. 17 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2005, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Olea> Quer> Urti> Poa> Chen> Zygo> Palm> Plan>Rume

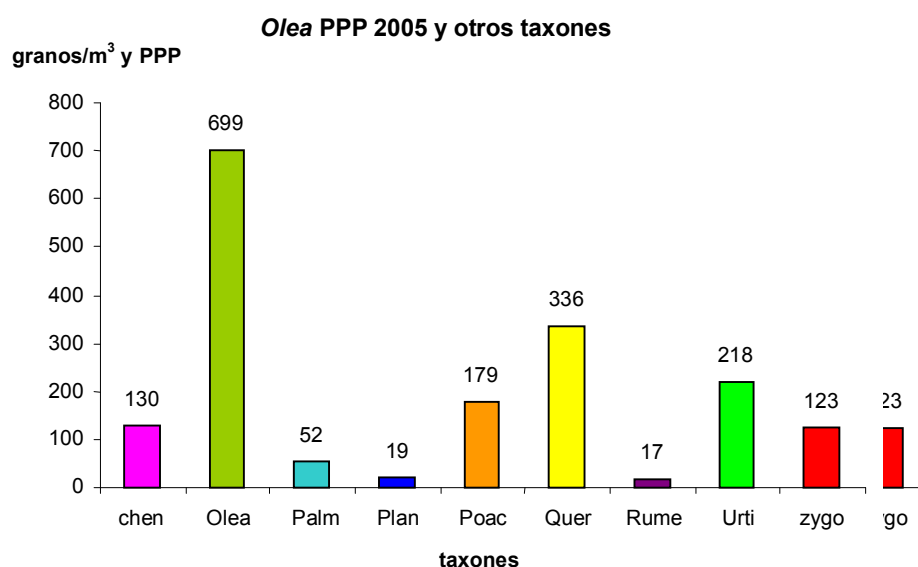


Figura 6. 18 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2006, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Olea> Urti> Poa> Quer> Chen> Zygo> Palm> Plan>Rume

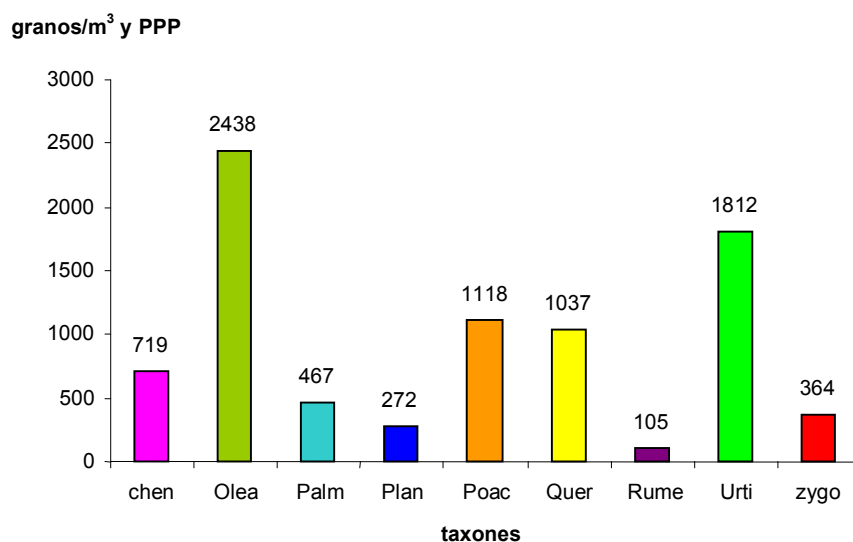


Figura 6. 19 Concentración acumulada de *Olea* y otros taxones representativos en su Periodo Principal de Polinización en el año 2007, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*.

Olea> Quer> Poa> Urti> Chen> Zygo> Plan> Palm>Rume

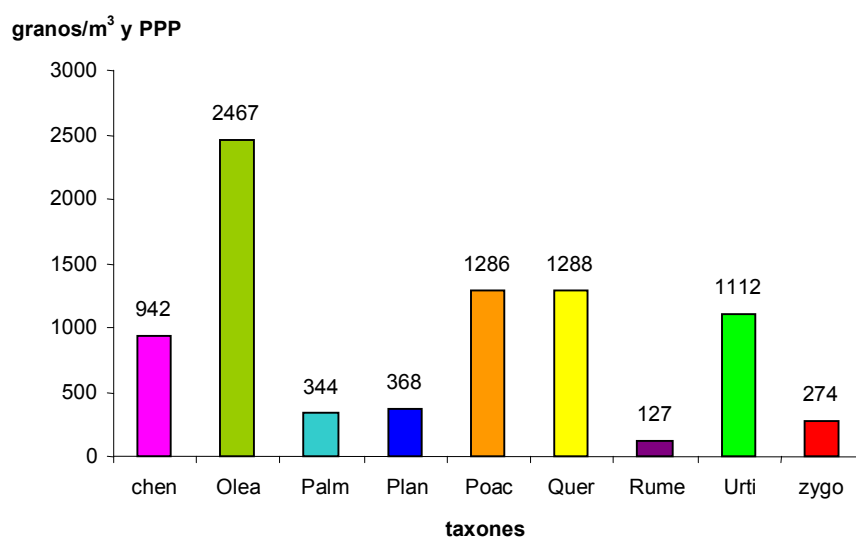


Tabla 6. 14 Valores de los Percentiles 90, 95 y 99 para *Olea* y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, *Chenopodiaceae*-*Amaranthaceae*, *Palmae*, *Platanus*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex*, *Urticaceae* y *Zygophyllum*, granos/m³, para el conjunto de los datos del periodo 2000-2007.

<i>OLEA</i> P90	<i>OLEA</i> P95	<i>OLEA</i> P99
53	99	243
URTI P90	URTI P95	URTI P99
35	49	84
PALM P90	PALM P95	PALM P99
10	17	45
POA P90	POA P95	POA P99
29	48	103
QUER P90	QUER P95	QUER P99
33	49	93
RUME P90	RUME P95	RUME P99
3	5	9
CHEN P90	CHEN P95	CHEN P99
29	48	54
ZYGO P90	ZYGO P95	ZYGO P99
10	17	37
PLAN P90	PLAN P95	PLAN P99
12	17	78

Tabla 6. 15 Niveles de polen en la atmósfera de Cartagena calculados según criterios estadísticos para *Olea* y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Platanus*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*, granos/m³, para el conjunto de los datos del periodo 2000-2007.

<i>Taxón</i>	<i>Nivel bajo</i>	<i>Niveles medios</i>	<i>Nivel alto</i>	<i>Nivel muy alto</i>
	granos/m ³			
<i>Olea</i>	<53	53-99	100-243	>243
Urticaceae	<35	35-49	50-84	>84
<i>Palmae</i>	<10	10-17	18-45	>45
Poaceae	<29	29-48	49-103	>103
<i>Quercus</i>	<33	33-49	50-93	>93
Chenopodiaceae-Amaranthaceae	<29	29-48	49-54	>54
<i>Zygophyllum</i>	<10	10-17	18-37	>37
<i>Plantago</i>	<12	12-17	18-78	>78
<i>Rumex</i>	<3	3-5	6-9	>9

Tabla 6. 16 Correlaciones bivariadas de Pearson entre *Olea* y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Plantago*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, Urticaceae y *Zygophyllum*, incluyendo en el análisis los recuentos correspondientes al PPP.

		<i>Olea</i>	Chen	Plan	Palm	Poac	Quer	Rume	Urti	Zygo	Total
Olea	Correlación	1									
	Significación N	564									
Chen	Correlación	0,185	1								
	Significación N	0 564	564								
Plan	Correlación	<i>0,096</i>	0,44	1							
	Significación N	<i>0,022</i> 564	0 564	564							
Palm	Correlación	-0,02	0,079	<i>0,092</i>	1						
	Significación N	0,632 564	0,06 564	<i>0,029</i> 564	564						
Poac	Correlación	0,644	0,32	0,218	0,014	1					
	Significación N	0 564	0 564	0 564	0,747 564	564					
Quer	Correlación	0,364	0,37	0,269	0,056	0,52	1				
	Significación N	0 564	0 564	0 564	0,184 564	0 564	564				
Rume	Correlación	0,371	0,39	0,338	0,2	0,54	0,56	1			
	Significación N	0 564	0 564	0 564	0 564	0 564	0 564	564			
Urti	Correlación	0,248	0,61	0,496	0,11	0,43	0,38	0,46	1		
	Significación N	0 564	0 564	0 564	0,01 564	0 564	0 564	0 564	564		
Zygo	Correlación	0,164	0,046	0,259	0,17	0,27	0,3	0,24	0,23	1	
	Significación N	0 564	0,277 564	0 564	0 564	0 564	0 564	0 564	0 564	564	
Total	Correlación	0,801	0,54	0,407	0,026	0,82	0,71	0,63	0,64	0,3	1
	Significación N	0 564	0 564	0 564	0,544 564	0 564	0 564	0 564	0 564	0 564	564

Negrita: La correlación es significativa al nivel 0,01 bilateral

Cursiva: La correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

Tabla 6. 17 Correlaciones bivariadas de Pearson entre *Olea* y el resto de los tipos polínicos importantes durante su PPP, *Chenopodiaceae-Amaranthaceae*, *Palmae*, *Plantago*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex*, *Urticaceae* y *Zygophyllum*, incluyendo en el análisis los recuentos anuales completos.

		<i>Olea</i>	Chen	Plan	Palm	Poac	Quer	Rume	Urti	Zygo	Total
Olea	Correlación Significación N	1 2922									
Chen	Correlación Significación N	0,018 0,333 2922	1 2922								
Plan	Correlación Significación N	0,207 0 2922	0,068 0 2922	1 2922							
Palm	Correlación Significación N	0,264 0 2922	0,05 0,004 2922	0,377 0 2922	1 2922						
Poac	Correlación Significación N	0,678 0 2922	0,036 0,052 2922	0,341 0 2922	0,42 0 2922	1 2922					
Quer	Correlación Significación N	0,435 0 2922	<i>0,04</i> 0,046 2922	0,373 0 2922	0,48 0 2922	0,58 0 2922	1 2922				
Rume	Correlación Significación N	0,458 0 2922	0,05 0,006 2922	0,433 0 2922	0,62 0 2922	0,61 0 2922	0,63 0 2922	1 2922			
Urti	Correlación Significación N	0,351 0 2922	<i>0,05</i> 0,015 2922	0,551 0 2922	0,64 0 2922	0,52 0 2922	0,46 0 2922	0,56 0 2922	1 2922		
Zygo	Correlación Significación N	0,366 0 2922	0,018 0,329 2922	0,416 0 2922	0,33 0 2922	0,52 0 2922	0,51 0 2922	0,47 0 2922	0,5 0 2922	1 2922	
Total	Correlación Significación N	0,582 0 2922	0,55 0 2922	0,403 0 2922	0,5 0 2922	0,61 0 2922	0,54 0 2922	0,56 0 2922	0,6 0 2922	0,44 0 2922	1 2922

Negrita: La correlación es significativa al nivel 0,01 bilateral

Cursiva: La correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

6.2. Resultados cuantificación aeroalérgenos.

En los siguientes epígrafes se presentan los resultados de la cuantificación de los aeroalérgenos Ole e 2 y Ole e 1 en el bioaerosol de Cartagena y los recuentos de *Olea* para los mismos periodos de tiempo muestreados, también se analiza la correlación existente entre los recuentos de *Olea* y los valores de la cuantificación de Ole e 1.

6.2.1. Cuantificación de la profilina Ole e 2.

Se cuantificó la presencia de la profilina Ole e 2 en las muestras recogidas entre el 20 de mayo y el 16 de junio de 2002, obteniendo valores por encima del límite de detección de la técnica únicamente en las cuatro muestras recogidas entre los días 23 y 29 de mayo. La figura 6.20 recoge la curva de calibración para Ole e 2. En la tabla 6.18 se muestran los resultados de la cuantificación de Ole e 2 cuando se han encontrado por encima del índice de detección.

Figura 6. 20 Curva de calibración para la cuantificación de Ole e 2.

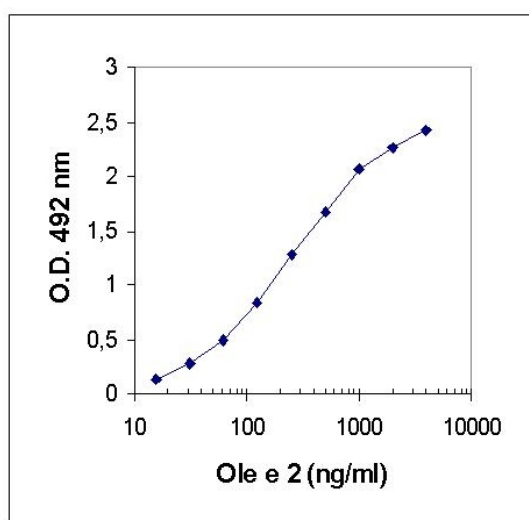


Tabla 6. 18 Resultados de la cuantificación de Ole e 2, la tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de *Olea* y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 2.

Muestra	Fecha inicio muestreo	Fecha final muestreo	Recuento <i>Olea</i> , granos/m ³	Totales, granos/m ³	Ole e 2, pg/m ³
39	210502	220502	18	40	<LD
40	220502	230502	24	94	152,10
41	230502	240502	90	294	102,60
42	240502	270502	89	302	46,10
43	270502	280502	96	416	87,00
44	280502	290502	30	137	<LD

6.2.2. Cuantificación de Ole e 1

6.2.2.1. Año 2003.

En la figura 6.21 se presenta, como ejemplo, la curva de calibración de Ole e 1 obtenida en el año 2003, el resto de los años se han realizado las oportunas curvas de calibrado, obteniendo las correspondientes representaciones gráficas. En la tabla 6.19. se recogen los resultados de la cuantificación de Ole e 1, realizada con las muestras tomadas entre el 5 de mayo y el 5 de junio de 2003.

Figura 6. 21 Curva de calibración para la cuantificación de Ole e 1 en la muestras de 2003.

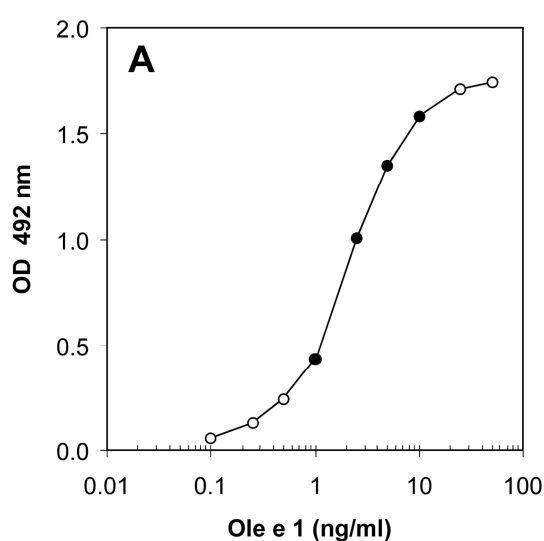


Tabla 6. 19 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2003. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de *Olea* y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.

Muestra	Fecha inicio muestreo	Fecha final muestreo	Recuento <i>Olea</i> , granos/m ³	Totales, granos/m ³	Ole e 1, pg/m ³
38	2-5-03	5-5-03	3	61	2,17
39	5-5-03	6-5-03	33	68	7,17
40	6-5-03	7-5-03	10	47	8,24
41	7-5-03	8-5-03	9	54	3,71
42	8-5-03	9-5-03	4	33	9,34
43	9-5-03	12-5-03	10	62	1,57
44	12-5-03	13-5-03	10	62	6,24
45	13-5-03	14-5-03	11	36	1,39
46	14-5-03	15-5-03	7	72	7,06
47	15-5-03	16-5-03	39	123	139,30
48	16-5-03	19-5-03	181	476	229,46
49	19-5-03	20-5-03	149	410	640,42
50	20-5-03	21-5-03	69	261	170,08
51	21-5-03	22-5-03	17	120	66,96
52	22-5-03	23-5-03	6	39	6,02
53	23-5-03	26-5-03	63	263	138,46
54	26-5-03	27-5-03	54	141	109,61
55	27-5-03	28-5-03	14	57	61,16
56	28-5-03	29-5-03	6	60	4,80
57	29-5-03	30-5-03	6	38	6,15
58	30-5-03	2-6-03	4	29	1,87
59	2-6-03	4-6-03	9	32	2,13
60	4-6-03	5-6-03	3	14	0,70

6.2.2.2. Año 2004.

En la tabla 6.20 se recogen los resultados de la cuantificación de Ole e 1, realizada con las muestras tomadas entre el 15 de abril y el 20 de mayo.

Tabla 6. 20 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2004. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de *Olea* y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.

Muestra	Fecha inicio muestreo	Fecha final muestreo	Recuento <i>Olea</i> , granos/m ³	Totales, granos/m ³	Ole e 1, pg/m ³
61	16-4-04	19-4-04	1	51	81,17
62	19-4-04	20-4-04	3	68	218,37
63	20-4-04	21-4-04	1	31	210,76
64	21-4-04	22-4-04	5	95	232,79
65	22-4-04	23-4-04	2	106	225,20
66	23-4-04	26-4-04	0	13	78,33
67	26-4-04	27-4-04	5	150	222,02
68	27-4-04	28-4-04	11	139	249,33
69	28-4-04	29-4-04	6	48	222,55
70	29-4-04	30-4-04	45	209	899,39
71	30-4-04	3-5-04	30	101	140,56
72	3-5-04	4-5-04	13	96	290,11
73	4-5-04	5-5-04	34	298	756,66
74	5-5-04	6-5-04	9	149	314,42
75	6-5-04	7-5-04	42	169	876,27
76	7-5-04	10-5-04	27	151	321,10
77	10-5-04	11-5-04	7	13	218,89
78	11-5-04	12-5-04	4	66	210,76
79	12-5-04	13-5-04	5	41	207,29
80	13-5-04	17-5-04	1	29	53,56
81	17-5-04	18-5-04	7	181	205,83
82	18-5-04	20-5-04	5	89	113,67

6.2.2.3. Año 2005.

En la tabla 6.21 se recogen los resultados de la cuantificación de Ole e 1, realizada con las muestras tomadas entre el 12 de mayo y el 15 de junio de 2004, como se ha indicado el captador Hirst estuvo estropeado desde el 2 de abril hasta el 11 de mayo.

Tabla 6. 21 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2005. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de *Olea* y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.

Muestra	Fecha inicio muestreo	Fecha final muestreo	Recuento <i>Olea</i> , granos/m ³	Totales, granos/m ³	Ole e 1, pg/m ³
155	12/05/05	13/05/05	44	98	1343,75
156	13/05/05	16/05/05	20	52	1656,25
157	16/05/05	17/05/05	111	237	5182,29
158	17/05/05	18/05/05	13	65	546,88
159	18/05/05	19/05/05	12	32	833,33
160	19/05/05	20/05/05	42	85	130,21
161	20/05/05	23/05/05	fallo	fallo	1097,22
162	23/05/05	24/05/05	27	81	843,75
163	24/05/05	25/05/05	7	69	182,29
164	25/05/05	26/05/05	5	43	83,33
165	26/05/05	27/05/05	2	20	57,29
166	27/05/05	30/05/05	8	41	74,65
167	30/05/05	31/05/05	44	75	291,67
168	31/05/05	01/06/05	76	146	291,67
169	01/06/05	02/06/05	49	117	1125,00
170	02/06/05	03/06/05	102	154	359,38
171	03/06/05	06/06/05	1	11	85,07
172	06/06/05	07/06/05	12	76	723,96
173	07/06/05	08/06/05	4	40	72,92
174	08/06/05	09/06/05	1	16	31,25
175	09/06/05	10/10/05	0	48	61,20
177	13/06/05	14/06/05	5	16	218,75
178	14/06/05	15/06/05	5	23	145,83
179	15/06/05	16/06/06	0	11	104,17

6.2.2.4. Año 2006.

En la tabla 6.22 se recogen los resultados de la cuantificación de Ole e 1, realizada con las muestras tomadas entre el 26 de abril y el 14 de junio de 2006.

Tabla 6. 22 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2006. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de *Olea* y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.

Muestra	Fecha inicio muestreo	Fecha final muestreo	Recuento <i>Olea</i> , granos/m ³	Totales, granos/m ³	Ole e 1, pg/m ³
131	26-4-06	27-4-06	2	27	72,16
132	27-4-06	28-4-06	1	27	105,74
133	28-4-06	2-5-06	10	79	116,73
134	2-5-06	3-5-06	16	107	59,83
135	3-5-06	4-5-06	6	27	55,38
136	4-5-06	5-5-06	15	60	244,24
137	5-5-06	8-5-06	163	218	1324,44
138	8-5-06	9-5-06	141	274	2589,18
139	9-5-06	10-5-06	82	239	1693,21
140	10-5-06	11-5-06	39	184	482,09
141	11-5-06	12-5-06	13	112	197,99
142	12-5-06	15-5-06	7	141	95,88
143	15-5-06	16-5-06	11	83	215,17
144	16-5-06	17-5-06	12	100	279,46
145	17-5-06	18-5-06	8	60	9,90
146	18-5-06	19-5-06	73	333	965,67
147	19-5-06	22-5-06	323	503	1742,67
148	22-5-06	23-5-06	2	35	2752,86
149	23-5-06	24-5-06	2	30	598,55
150	24-5-06	25-5-06	15	142	209,49
151	25-5-06	26-5-06	27	253	165,10
152	26-5-06	29-5-06	90	353	55,41
153	29-5-06	30-5-06	13	73	167,63
154	30-5-06	31-5-06	13	69	110,42
155	5-6-06	6-6-06	10	132	38,58
156	6-6-06	7-6-06	4	42	16,89
157	7-6-06	12-6-06	2	38	6,51
158	12-6-06	13-6-06	26	204	14,30
159	13-6-06	14-6-06	4	19	40,95

6.2.2.5. Año 2007.

En la tabla 6.23 se recogen los resultados de la cuantificación de Ole e 1, realizada con las muestras tomadas entre

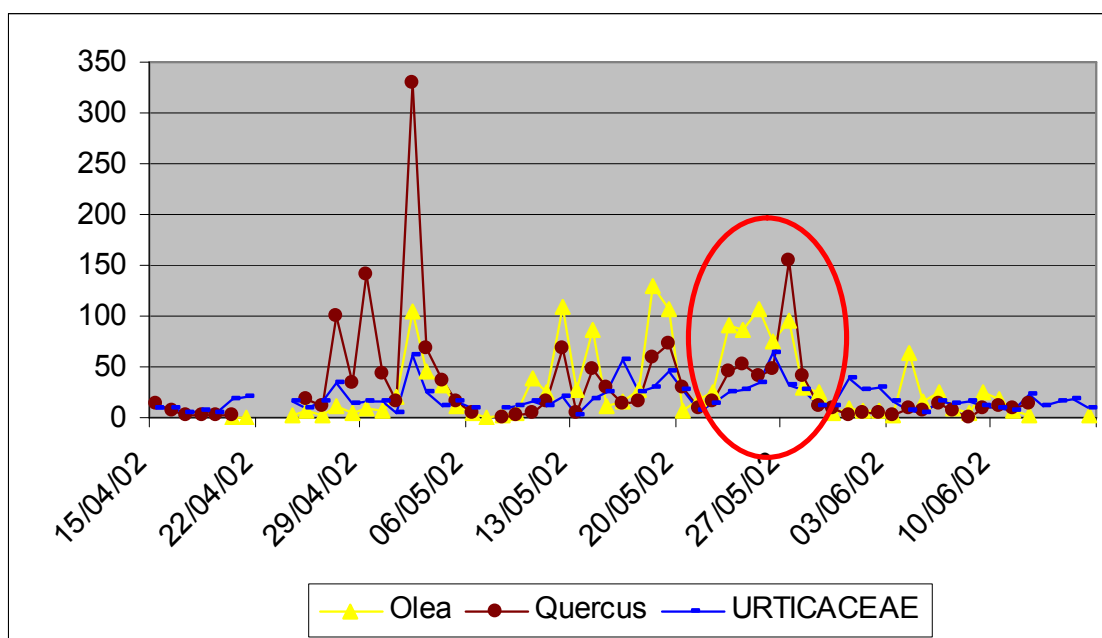
Tabla 6. 23 Resultados de la cuantificación de Ole e 1, año 2007. La tabla incluye las fechas de muestreo y los recuentos de *Olea* y pólenes totales de los periodos de muestreo, junto con los resultados de la cuantificación de Ole e 1.

Muestra	Fecha inicio muestreo	Fecha final muestreo	Recuento <i>Olea</i> , granos/m ³	Totales, granos/m ³	Ole e 1, pg/m ³
348	18-5-07	21-5-07	47	986	197,04
349	21-5-07	22-5-07	47	375	214,77
350	22-5-07	23-5-07	7	99	35,14
351	23-5-07	24-5-07	16	134	70,28
352	24-5-07	25-5-07	30	241	3519,08
353	25-5-07	28-5-07	173	1831	633,79
354	28-5-07	29-5-07	70	390	140,56
355	29-5-07	30-5-07	126	326	2098,39
356	30-5-07	31-5-07	93	269	1415,66
357	31-5-07	1-6-07	67	396	20,08
358	1-6-07	4-6-07	20	1158	143,07
359	4-6-07	5-6-07	7	97	20,08

6.2.3. Recuentos de *Olea* y cuantificación de aeroalérgenos.**6.2.3.1. Recuentos de granos de polen y cuantificación de Ole e 2.**

La figura 6.22 muestra los valores de los recuentos de los tipos polínicos *Olea*, *Urticaceae* y *Quercus* desde el 15 de abril hasta el 16 de junio de 2002.

Figura 6. 22 Valores de los recuentos de los tipos polínicos *Olea*, Urticaceae y *Quercus* entre los días 15 de abril y 16 de junio de 2002, se señala con una elipse roja el intervalo de días en los que en las muestras para la cuantificación de aeroalérgenos se han encontrado valores por encima del límite de detección para la profilina Ole e 2.



6.2.3.2. Recuentos de *Olea* y cuantificación de Ole e 1.

Las figuras 6.23 a 6.27 recogen los valores normalizados de los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1 para los años 2003 a 2007.

Figura 6. 23 Valores normalizados de los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1 del año 2003, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.

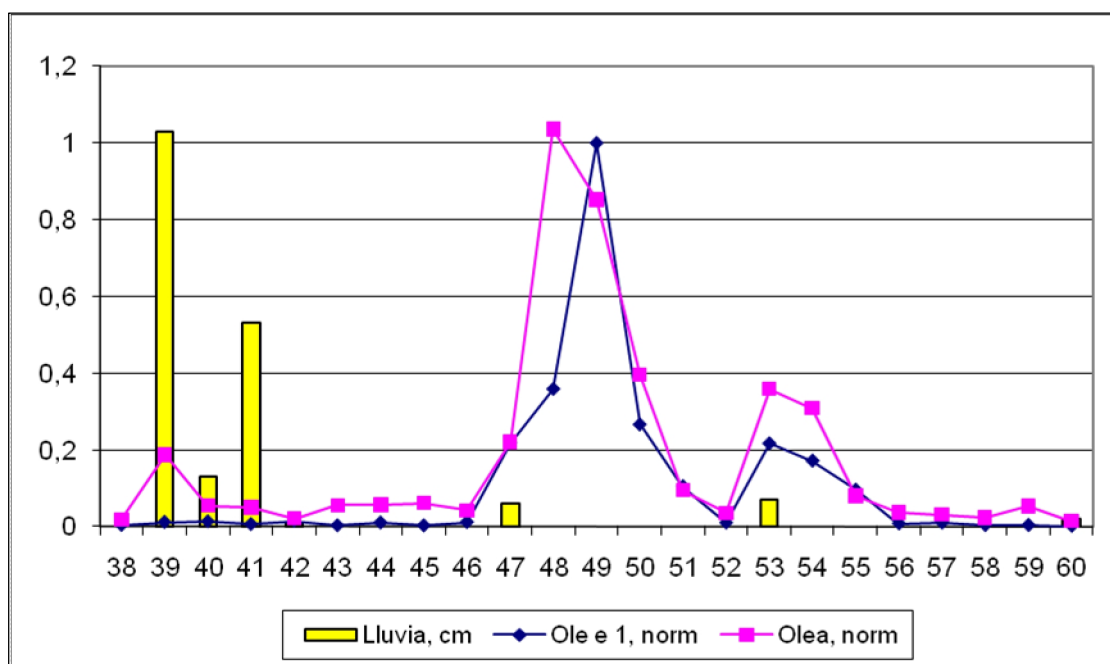


Figura 6. 24 Valores normalizados de los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1 del año 2004, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.

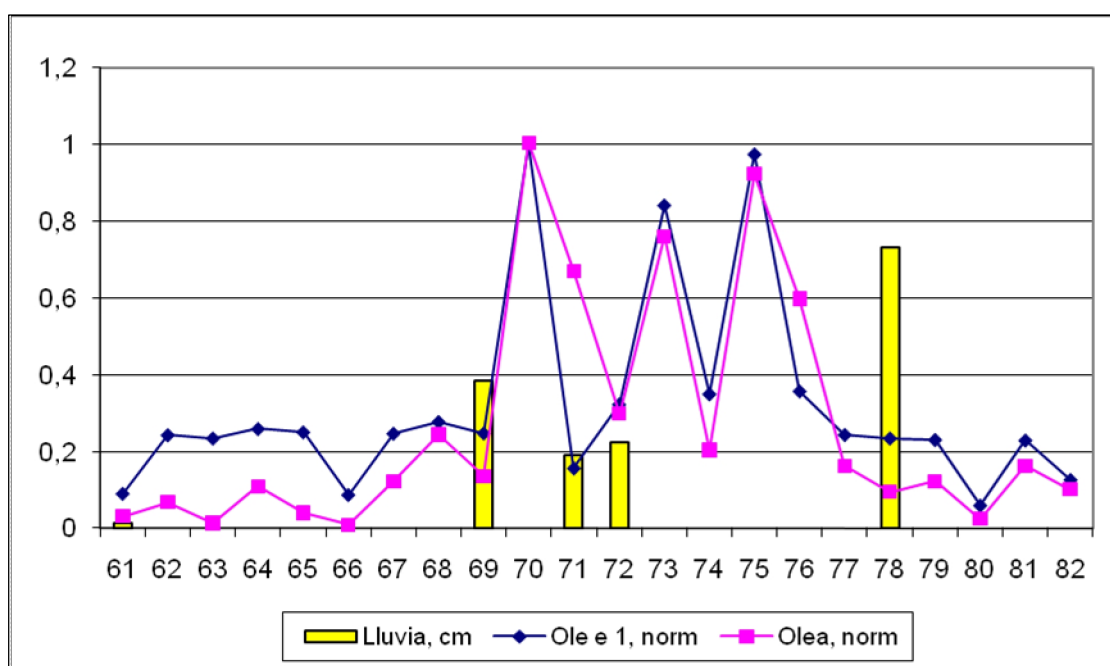


Figura 6. 25 Valores normalizados de los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1 del año 2005, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.

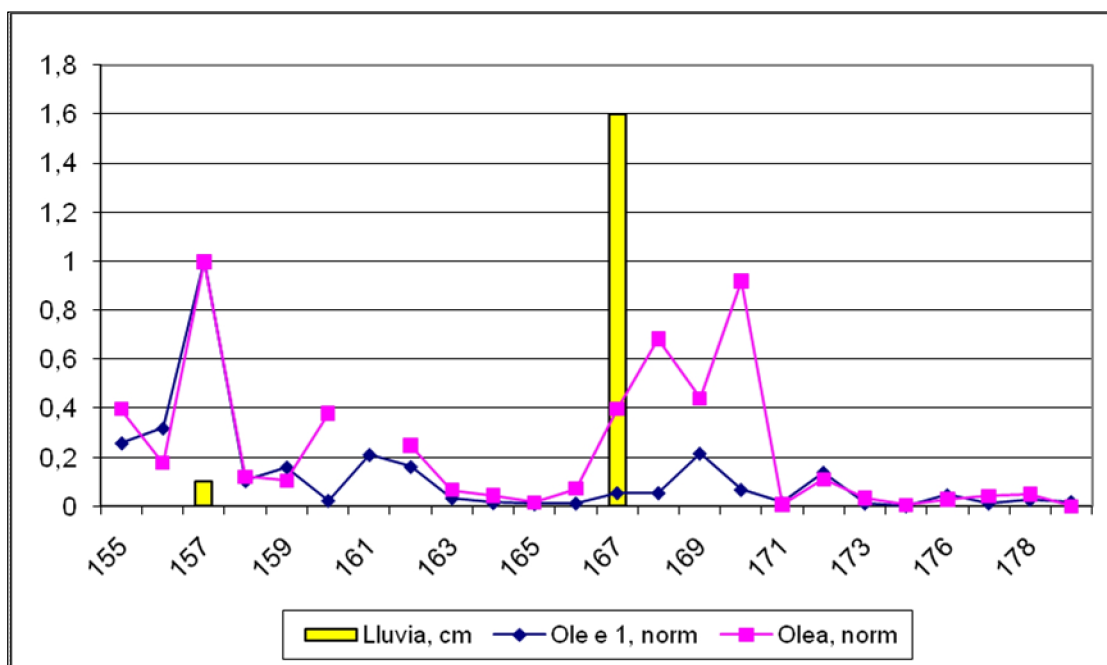


Figura 6. 26 Valores normalizados de los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1 del año 2006, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.

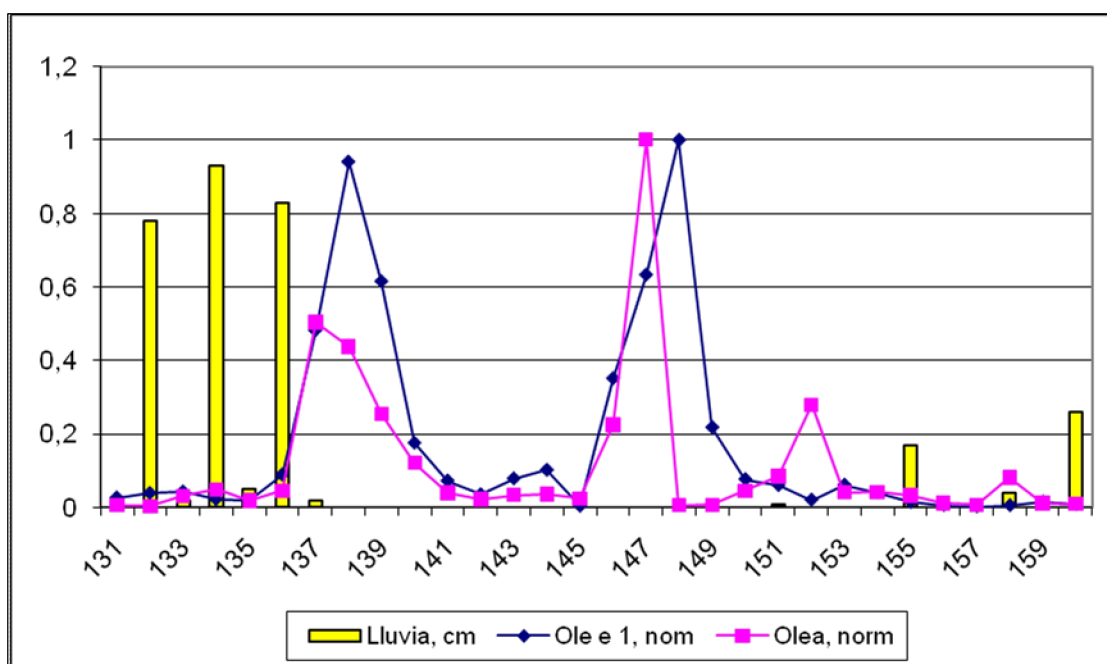


Figura 6. 27 Valores normalizados de los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1 del año 2007, se muestran como barras las lluvias recogidas en cm.

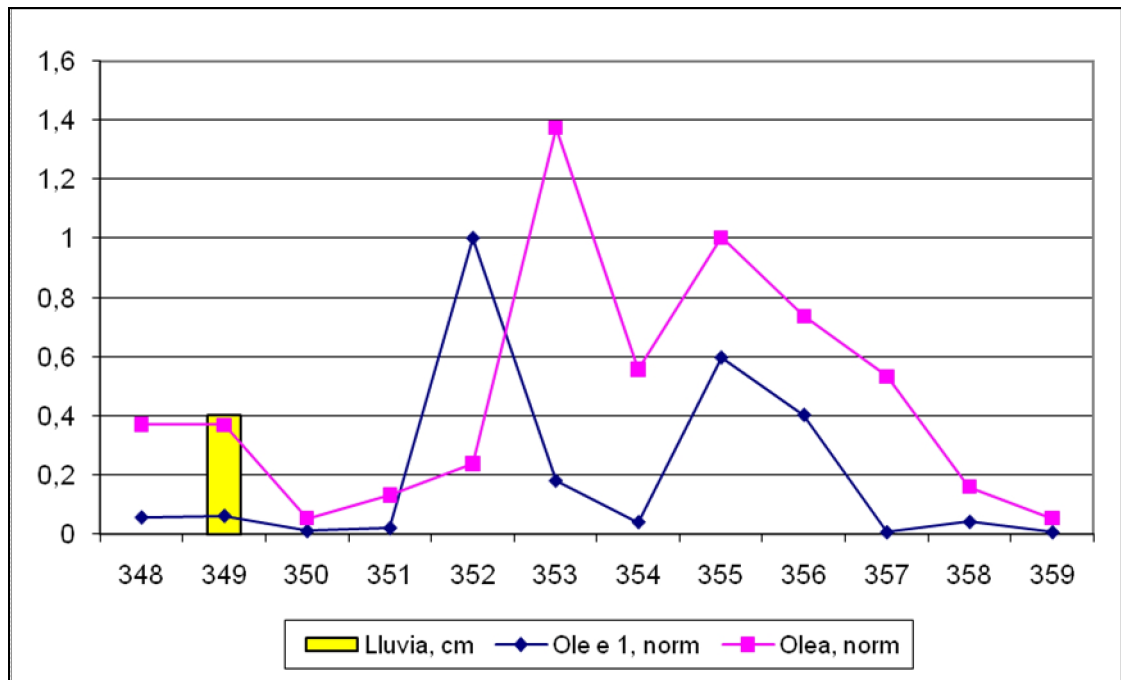


Tabla 6. 24 Coeficientes de correlación de Pearson entre los recuentos en el bioaerosol de *Olea*, los recuentos totales, granos/m³ de aire, y la cuantificación de Ole e 1, pg/m³. N, tamaño de la muestra, para cada uno de los años estudiados y el conjunto del periodo.

Año			<i>Olea</i> , granos/m ³	Pólenes totales, granos/m ³
2003	Pólenes totales, granos/m ³	Correlación	,975	
		Significación	,000	
		N	23	
	Ole e 1, pg/m ³	Correlación	,834	,833
		Significación	,000	,000
		N	23	23
2004	Pólenes totales, granos/m ³	Correlación	,708	
		Significación	,000	
		N	22	
	Ole e 1, pg/m ³	Correlación	,861	,737
		Significación	,000	,000
		N	22	22
2005	Pólenes totales, granos/m ³	Correlación	,942	
		Significación	,000	
		N	23	
	Ole e 1, pg/m ³	Correlación	,618	,722
		Significación	,002	,000
		N	23	23
2006	Pólenes totales, granos/m ³	Correlación	,839	
		Significación	,000	
		N	29	
	Ole e 1, pg/m ³	Correlación	,573	,417
		Significación	,001	,024
		N	29	29
2007	Pólenes totales, granos/m ³	Correlación	,556	
		Significación	,061	
		N	12	
	Ole e 1, pg/m ³	Correlación	,239	-,137
		Significación	,454	,671
		N	12	12
Total periodo	Pólenes totales, granos/m ³	Correlación	,380	
		Significación	,000	
		N	109	
	Ole e 1, pg/m ³	Correlación	,462	,158
		Significación	,000	,101
		N	109	109

Negrita: La correlación es significativa al nivel 0,01 bilateral.

Cursiva: La correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

7. DISCUSIÓN

7. Discusión

Los niveles atmosféricos del taxón *Olea europaea* referenciados como índices polínicos y expresados como granos/m³ y año durante el periodo de estudio, años 2000 a 2007 (tabla 6.1), alcanzan un valor mínimo que se sitúa en el año 2000 con 730 granos/m³, y un máximo en el 2007 con 2476 granos/m³ (Figura 6.1). Los datos de polen se han obtenido por recuento de las muestras diarias polínicas recolectadas con un captador volumétrico tipo Hirst y analizadas usando la metodología estandarizada de la Red Española de Aerobiología (Galán *et al*, 2007). Desde el punto de vista clínico el conocimiento de los niveles atmosféricos de los pólenes alergénicos, su estacionalidad, variabilidad intranual o interanual, es una información valiosa para la planificación de tratamientos y actividades de los pacientes alérgicos (Subiza, 2003). Hasta la fecha se considera que el grano de polen es la principal fuente de aeroalérgenos en la atmósfera, habiéndose indicado que los granos de polen alergénicos representan del 20 al 30% del total anual, en el que suele dominar algún tipo polínico alergénico (Ong *et al*, 1995).

Los muestreos aerobiológicos con el método de Hirst en la ciudad de Cartagena se iniciaron en marzo del año 1993 hasta la fecha, sin interrupción. El equipo sólo ha estado fuera de servicio para operaciones de mantenimiento, o por avería, la incidencia más importante se produjo en el año 2005, ya que el equipo se averió coincidiendo con la floración de los principales taxones de nuestra zona, desde el 1 de abril hasta el 10 mayo, lo que unido a otros días de averías ocasionó una pérdida de 88 datos en la serie temporal.

Es necesario conocer la evolución en el tiempo para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos en el periodo de estudio ya que, es bien conocido que las concentraciones de polen atmosférico presentan gran variabilidad a lo largo del tiempo, en horas, días, estaciones y años, siendo necesario disponer de varios años de datos para calcular los valores medios de polen (índices polínicos atmosféricos) y evidenciar los cambios en sus tendencias (Voltolini *et al*, 2000).

La presencia media de *Olea* en el periodo completo 2000-2007 es del 13,35% (tabla 6.1). Si de este periodo eliminamos el año 2005, ya que el captador

estuvo estropeado desde el 1 de abril hasta 10 mayo, se obtiene un 13,44% de *Olea* con respecto al cómputo total de polen en dicho periodo, porcentaje muy similar al anterior. En el periodo 1993-1999 (Elvira-Rendueles, 2001) la presencia de *Olea* era del 10,13%, así pues, *Olea* en el periodo correspondiente a la primera década del siglo XXI, tiene una mayor representatividad en el espectro polínico de la ciudad de Cartagena que el que tenía en la última década del siglo XX. Valores similares a los nuestros se producen en Chirivel, Almería, con una representación frente al polen total del 15% (Cariñanos *et al*, 2002).

La mayor representatividad de *Olea* en los recuentos de Cartagena se da en el año 2001, con, prácticamente, el 25% de los granos de polen presentes en la atmósfera, seguido del año 2003 (15%), 2006 (14%) y 2000 (12,6%) (Tabla 6.1). En un estudio previo, al analizar la evolución de los taxones polínicos más representativos en la ciudad en el periodo 1993-2003, se encontró que en los primeros años del siglo XXI, con respecto a *Olea*, se producía un incremento en los recuentos anuales, dándose de modo paralelo un aumento de la presencia de taxones arbóreos en detrimento de los taxones herbáceos, fundamentalmente Urticaceae (Elvira-Rendueles *et al*, 2004).

Estos índices anuales del taxón *Olea* y sus porcentajes en el espectro polínico total en nuestra área geográfica son bajos comparados con los índices anuales registrados en otras ciudades del sur y suroeste de España, como ocurre en algunas ciudades de Andalucía y del sur de Extremadura. En Priego de Córdoba y Jaén se registran valores medios semanales que superan los 4500 granos/m³ y semana (Trigo, 1998); en Córdoba es el taxón mayoritario del cómputo total anual (Alcázar *et al*, 2002); en Málaga su porcentaje anual varía entre el 21,1% y el 33,1% (Recio *et al*, 2002); y en Granada se obtiene un total de 28481 granos/m³ en el 2001 (Alba *et al*, 2002), valores sin duda muy alejados de los de Cartagena. Sin embargo, comparados con áreas geográficas del norte y noroeste, como La Guardia con un 1,6% (Rodríguez Rajo *et al*, 2002), Bilbao un 2,08% (Antepara *et al*, 1995), Barcelona un 2% (Belmonte, 1988), la representatividad en Cartagena es muy superior.

En Madrid, *Olea* representa el 8,9% del polen total anual, paralelamente el 60% de la población con polinosis da reacción positiva en las pruebas cutáneas a este tipo polínico (Subiza *et al*, 1995). En nuestra zona, en un estudio realizado en 2004 por los doctores Negro y Miralles en las consultas externas del hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia, el 60,02% de los pacientes alérgicos dan positivo las pruebas cutáneas frente a *Olea*. Dato muy similar al obtenido en Madrid, y que da idea de la importancia en nuestra zona de este taxón en relación con las enfermedades alérgicas.

Se ha señalado una oscilación bianual en los recuentos de *Olea*, así es característico de este tipo polínico presentar amplias variaciones interanuales (Subiza *et al*, 1998) (D'Amato, 2000), que se relacionan con el llamado “fenómeno de alternancia de cultivos” en el que se alternan años con numerosas emisiones de granos de polen con otros de escasa concentración polínica, fenómeno demostrado en estudios aerobiológicos de la ciudad de Sevilla (Conde *et al*, 2004). En zonas olivareras se ha descrito que este fenómeno es consecuencia tanto de factores endógenos que afectan a la planta, y de factores exógenos, relacionados con las prácticas agrícolas, como pueden ser las podas intensivas (Candau *et al*, 2002). En nuestro caso este fenómeno no es tan evidente, posiblemente dado el importante uso ornamental de esta planta en nuestra zona. Como se ha relatado en el punto 4.2.7.1., el Olivar, no ha sido tradicionalmente un cultivo intensivo en nuestra área geográfica, aunque el impulso de la agricultura ecológica sí ha supuesto un incremento de los olivares en la zona noroeste de la comunidad autónoma de la Región de Murcia desde 1996 (Teruel, 2006). Sin embargo, su uso ornamental está muy extendido en parques, jardines, rotondas y zonas turísticas residenciales.

Al analizar las variaciones interanuales del polen total y de *Olea* en el periodo de estudio (Figura 6.1), se observa que las variaciones en las concentraciones anuales de *Olea* no están en relación directa con las variaciones registradas en las concentraciones anuales totales, así entre los años 2000 y 2001 apenas hay variación en los granos de polen totales, pero la concentración de *Olea* se duplica, con una importante disminución de las precipitaciones. Todavía se produce una nueva disminución de las precipitaciones en el año 2002, a pesar de

ello, los recuentos anuales totales se incrementan en este año, sin producirse la misma magnitud en el incremento del taxón *Olea*. Efecto contrario podemos observar en los años 2006 y 2007, en los que las concentraciones de *Olea* apenas varían, mientras que se produce un incremento importante en los recuentos de granos de polen totales, con un incremento también en las lluvias.

La incidencia de alergia al polen de las plantas y árboles utilizados tradicionalmente como ornamentales no ha sido profundamente investigada quizás por la poca consecuencia médica del potencial alergénico del polen que liberan estas plantas (Puiggrós *et al*, 2008) aunque el uso de plantas ornamentales supone un problema particular de exposición a una parte de la población a nuevas fuentes de polen. Es conocido que el uso ornamental de especies de Cupressaceae y *Platanus* son causa muy importante de alergia en el área Mediterránea (D'Amato *et al*, 2000) (Negro *et al*, 2004) (Clot, 2007). En la ciudad de Barcelona el 37% de especies arbóreas alergénicas son ornamentales (Belmonte, 1998). Un estudio realizado en Suiza pone de manifiesto el incremento de la presencia de polen de *Olea* en su atmósfera por la progresiva introducción de este árbol como planta ornamental en el país (Clot, 2007).

La SEIAC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica) en su página web indica que la calidad de vida de los 6 millones de alérgicos es cada día peor, entre otras causas, por el uso por parte de ayuntamientos y particulares de plantas ornamentales potencialmente muy alergénicas. El uso ornamental de *Olea* en la ciudad o en las zonas residenciales supone una sobreexposición de dicho alérgeno a la población sensible existente, este problema no sólo contribuye al incremento del espectro alergénico polínico, sino que los síntomas de polinosis se han extendido a lo largo del año y no sólo a la primavera, como sucedía antes.

La influencia del polen de olivo en los procesos alérgicos es cada día más evidente, así en un estudio epidemiológico multicéntrico realizado por la European Community Respiratory Health Survey en 37 centros pertenecientes a 17 ciudades europeas, sobre los alérgenos más sensibilizantes en la población adulta europea, incluye al polen de Olivo como uno de los 7 alérgenos más importantes (ácaros, pelo gato, gramíneas, abedul, olivo, *Cladosporium* y

Alternaria) desencadenantes de afecciones respiratorias alérgicas (Bousquet *et al*, 2007).

En el área Mediterránea por sus condiciones climáticas caracterizadas por inviernos suaves y veranos secos y cálidos, los granos de polen alergénicos dominantes son el olivo, el ciprés y la *Parietaria* (D'Amato *et al*, 2000).

El aire, en las zonas urbanas del Mediterráneo, en días muy soleados y con elevada radiación ultravioleta presenta elevadas concentraciones de ozono que es uno de los contaminantes atmosféricos sometidos a regulación. Así en Nápoles se ha visto que en los meses de mayo y junio, cuando se alcanzan los niveles máximos de ozono y partículas PM 10, se produce un aumento de crisis asmáticas y urgencias respiratorias en pacientes alérgicos a *Parietaria*, por lo que la alergia al polen es uno de los modelos más utilizados para estudiar la correlación entre la contaminación atmosférica y la enfermedades respiratorias alérgicas (D'Amato, 2000).

Sin duda, la climatología local tiene una clara influencia en los índices polínicos atmosféricos, siendo una de las causas de la variabilidad interanual de los diferentes taxones. Desde 1993 (25891 granos/m³ y año) hasta el año 2000 (5777 granos/m³ y año) se ha ido produciendo un descenso continuo en el recuento de polen total en Cartagena como consecuencia de una persistente sequía que afectó fundamentalmente a los taxones herbáceos (Elvira-Rendueles, 2001). A partir de 2001 (5959 granos/m³ y año) se produce un incremento de los recuentos de los pólenes totales hasta alcanzar su máximo en el año 2007 (21517 granos/m³ y año) (Tabla 6.1), posiblemente por unas condiciones climáticas más favorables. La influencia de las lluvias con respecto al taxón *Olea* se han estudiado año a año (Figuras 6.2 a 6.9). Se puede observar en estas figuras como las lluvias acaecidas durante el periodo de polinización producen el fenómeno de lavado atmosférico (años 2004 y 2006), disminuyendo los recuentos de *Olea*, pero el índice pluviométrico anual no está en relación directa con el recuento total de *Olea*. Las lluvias que se producen en la primavera impiden la emisión y dispersión de polen con una consecuente reducción de los taxones primaverales (Sabariego *et al*, 2002), y su presencia y frecuencia reducen los recuentos de taxones como *Olea*

en comparación con otros años de inviernos lluviosos y primaveras más secas (Martín *et al*, 2002). Hecho ampliamente documentado, a saber, que las lluvias caídas en el periodo de polinización producen una disminución de los recuentos, por lavado atmosférico (fácilmente demostrable con herramientas estadísticas) mientras que las lluvias producidas fuera de este periodo, con anterioridad, en general, originan mayores liberaciones de granos de polen a la atmósfera (siendo este hecho difícil de demostrar con herramientas estadísticas).

Aunque las variaciones interanuales de *Olea* dependen fundamentalmente del fenómeno de alternancia de cultivos, estudios aerobiológicos realizados en Toledo y Ciudad Real ponen de manifiesto cómo la lluvia estacional o la inestabilidad atmosférica (vientos / calmas) son también determinantes en las cantidades de polen recolectado (Conde *et al*, 2002).

Sin duda, los índices polínicos de *Olea* en nuestra atmósfera tienen una gran importancia desde el punto de estudio de la polinosis estacional. El último estudio realizado por la Sociedad de Alergología Clínica de España (Alergológica 2005) sobre enfermedad alérgica en España, indica que el 21,5% de la población sufre rinitis alérgica, siendo los síntomas alérgicos más comunes la rinoconjuntivitis (55%) seguido del asma alérgico (28%). En el estudio, la Región de Murcia es la que registra el mayor número de casos de rinoconjuntivitis (68,9%) y de asma (42,6%) siendo los aeroalérgenos la causa principal.

De los granos de polen relevantes causales de rinitis alérgica, *Olea europaea* es el segundo en todo el territorio nacional, afectando al 29,7% de la población alérgica tras el polen de gramíneas que afecta al 34,8% de la población estudiada. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el informe Alergológica 1992, donde la sensibilización a *Olea europaea* era del 27%, un 28,3% en la ciudad de Cartagena (Moreno *et al*, 1995), se observa un incremento de población alérgica al polen de olivo del 2,7% en los últimos 10 años.

En el año 2004 alergólogos clínicos del Hospital Virgen del Arrixaca y del Hospital General publican en la página web [alergomurcia](http://alergomurcia.com) que, tras realizar un estudio sobre el diagnóstico etiológico de la polinosis en sus consultas hospitalarias, el polen de *Olea europaea* es el responsable del 60,02% de las

rinitis alérgicas seguido por Chenopodiáceas 41,10%, gramíneas 40,79% y *Parietaria* 39,06%. Además hacen hincapié en resaltar un incremento de pacientes polisensibilizados (Negro *et al*, 2004).

Como se ha comentado en el punto 4.2.8.12, la capacidad inductora de sensibilización alérgica en pacientes atópicos de un determinado taxón polínico se mide por el cumplimiento de los postulados de Thommen (Negrini, 1992). Negrini indica que de todos ellos, sin duda el más determinante es que dicho polen contenga antígenos capaces de inducir una respuesta Ig-E (alérgeno) para producir síntomas clínicos, como es el caso de *Olea*. Esto explicaría el que otros granos de polen como *Quercus* o *Pinus*, que cumplen el resto de los postulados, provoquen menos respuesta alérgica en la población, debido sin duda a su baja antigenemia (Spieskma, 1990). En Cartagena *Quercus* poliniza en el mismo periodo que *Olea* y se encuentra en concentraciones similares, mientras que *Pinus* presenta dos picos de concentración: uno alto en la estación preprimaveral (febrero, marzo) correspondiente a la especie mayoritaria en nuestra área *Pinus halepensis* y un pico menor en mayo que coincide con *Olea*, debido a la floración de *Pinus pinea* y de otras especies introducidas y usadas como ornamentales (Elvira-Rendueles, 2001). Ninguno de estos taxones aparece como agente etiológico de rinoconjuntivitis estacional en los estudios realizados en nuestra región (Negro *et al*, 2004) (Alergológica 2005).

Basados en la evidencia clínica, analizamos la influencia de *Olea*, en el espectro polínico de Cartagena, no sólo a lo largo del año sino durante su periodo de Polinización PPP para los años de estudio y además analizamos qué otros taxones de importancia alérgica comparten dicho periodo de polinización, para constatar la existencia de polisensibilizaciones y la posibilidad de reacciones cruzadas. Para ello lo primero que hemos hecho es calcular el PPP de *Olea* y conocer qué otros taxones de importancia están presentes en dicho periodo. A partir de los recuentos diarios del tipo polínico se ha definido el periodo anual donde se registra el 95% del total acumulado (Frenguelli *et al*, 2002) que constituye el PPP según el método descrito por Torben y Andersen en 1991. En la tabla 6.2 se detallan los datos aerobiológicos que definen el Periodo Principal de Polinización de *Olea* aplicando el método descrito por Andersen y Torben (1991)

para cada año en estudio, fecha de inicio del periodo de polinización, fecha de finalización del periodo de polinización, duración del periodo de polinización en días, valor pico y fecha en que se registra el valor pico anual. El periodo principal de polinización de *Olea* en los años estudiados, varía desde un mínimo de duración de su presencia en la atmósfera limitado a 60 días a un máximo 106 días (excluido el año 2005 ya que el captador estuvo averiado 44 días de la estación primaveral), tal y como se refleja en la tabla 6.2.

Sabiendo que dependiendo del método usado se pueden obtener resultados diferentes, y a veces muy dispares (Jato *et al*, 2006), se han ensayado otros métodos de cálculo (Tabla 6.3) y se han comparado. Aplicando los criterios de Persson y Nilson 1981, donde el PPP registra el 90% de polen total acumulado, los valores obtenidos eran muy similares a los obtenidos con el método Torben, y en ambos se observaban claras colas de inicio y final de la floración que agrupaban muchos valores nulos. Al complementar el método de Persson y Nilson con el criterio del método de Jäger *et al*, de 1996, en el cual el PPP comienza el primer día que se alcanza una concentración mayor del 1% del polen anual, sin que se produzcan más de 6 días con valor 0 cero, se produce una reducción de valores nulos, lo que se traduce en un acortamiento del PPP con un mínimo de 50 días en el año 2002 y un máximo de 75 días en el año 2007 (excluido el año 2005 por la rotura del captador, ya comentada). Estos periodos, con menos diferencias interanuales reflejan mejor la presencia de *Olea* referida a índices polínicos atmosféricos aunque el método Andersen y Torben represente mejor la fenología de dicho taxón.

Hay autores que difieren del concepto de cálculo del PPP relativo a valores porcentuales del total anual para calcular el inicio y final de la floración y mantienen el criterio de que la presencia mantenida en el tiempo de 1 grano de polen por metro cúbico de aire es indicativo de que se ha iniciado la floración aunque sólo se produce en algunas plantas que crecen en condiciones privilegiadas y liberan antes el polen, pero pronto le siguen el resto del grueso de plantas del mismo taxón (Belmonte *et al*, 2008). Es posible que pacientes muy sensibles sufran molestias cuando las concentraciones polínicas medidas en los captadores situados en lo alto de edificios son aún mínimas. Los niveles de polen

alcanzados a pie de calle y en ambientes muy concretos pueden ser superiores a los del ambiente globalizado que se mide en altura (Belmonte *et al*, 2008).

La floración de *Olea* en Cartagena se inicia por lo general en el mes de abril, prolongándose hasta finales de junio, adelantándose algunos años (2001 y 2004) a la última semana de marzo o retrasándose el final de la floración hasta el mes de julio (2007) con niveles máximos durante el mes de mayo (tablas 6.2 y 6.3). Este periodo de polinización es similar al registrado en el estudio de 27 ciudades españolas entre 1994 y 1999 por la SEIAC (Feo, 2003) y los datos publicados por la REA referentes a sus diferentes estaciones.

En general en España la floración de *Olea* se extiende de abril a junio, adelantándose un mes en las provincias más meridionales (Conde *et al*, 2002) aunque el periodo de máxima concentración polínica suele ser breve presentándose los niveles máximos en la segunda quincena del mes de mayo, favorecido por el incremento de la temperatura al final de la primavera (Feo, 2003). Si bien, a nivel nacional y europeo, parece claro el periodo de polinización, los síntomas clínicos en pacientes sensibles al polen de olivo no se limitan a dicho periodo sino que con frecuencia están presentes a lo largo del año, sin una clara explicación (D'Amato, 2000). Es cierto que muchos de estos pacientes están polisensibilizados sobre todo a gramíneas (de periodo de polinización mucho más extenso), siendo muy difícil saber cual de los dos pólenes es el prevalente.

En la Región de Murcia la rinoconjuntivitis estacional puede producir síntomas a lo largo de todo el año dadas las condiciones de temperatura y humedad de nuestra comunidad autónoma y la frecuencia con que los pacientes alérgicos desarrollan alergia a otros tipos polínicos y otros alérgenos presentes en diferentes épocas del año (Negro, 2004). La presencia de *Olea* en el mes de julio en pequeñas concentraciones puede ser debida a partículas de polen resuspendido, floraciones tardías, aporte de polen de larga distancia o la presencia de *Ligustrum* que no ha sido podado y se le deja florecer (su floración es más tardía que la de *Olea*) lo que tiene como consecuencia la prolongación de los síntomas de los pacientes alérgicos al olivo durante el verano (Feo, 2003). En el periodo de estudio, años 2000-2007 se observa una tendencia al alargamiento del periodo de

polinización que lo situaría en una media de 76 días, este valor parece seguir en incremento ya que los dos últimos años 2008 y 2009 presentan una media del periodo de polinización de 90 días (Elvira-Rendueles, 2009). Esta tendencia del alargamiento de la estación polínica con sus consecuencias sobre la población alérgica sensible se ha relacionado con el incremento de temperatura y la influencia del cambio climático (Beggs, 2005).

Los valores pico alcanzados durante el periodo de estudio presentan variaciones interanuales importantes que definen mejor el fenómeno de alternancia bianual de los cultivos (Conde *et al*, 2002). Los valores pico registrados (tabla 6.2) son para el año 2000 (90 granos/m³ y día); año 2001 (219 granos/m³ y día); año 2002 (129 granos/m³ y día); año 2003 (453 granos/m³ y día); año 2004 (246 granos/m³ y día); año 2005 (109 granos/m³ y día); año 2006 (518 granos/m³ y día) y año 2007 (311 granos/m³ y día).

En el informe Alergológica 2005 realizado con los datos de 27 ciudades españolas pertenecientes a 15 Comunidades Autónomas entre los años 1994 y 2003 (Feo, 2003), el valor pico medio en Murcia es de 162 granos/m³ y día, similar al de Valencia (164 granos/m³ y día) y Barcelona (153 granos/m³ y día). En Cartagena, el valor pico medio del periodo en estudio, 2000-2007, es superior con 259 granos/m³ y día, valor considerado moderado en dicho estudio y algo inferior a los registrados en Badajoz (347 granos/m³ y día), Elche (338 granos/m³ y día) o Madrid (313 granos/m³ y día). En Cartagena, valores pico superiores a los 300 granos/m³ y día se producen en los años que se superan los 2000 granos/m³ y año, es decir en los años 2003, 2006 y 2007 (tablas 6.2, 6.7 y 6.8) tan sólo un año 2006 supera los 500 granos/m³ y día.

Los niveles umbrales establecidos y referenciados como altos para *Olea*, y definidos previamente en el apartado 6.1.4, es decir, recuentos 200 granos/m³ y día, se dan con muy poca frecuencia en nuestra atmósfera.

La Red Española de Aerobiología propone una serie de categorías polínicas, considerando distintos umbrales, que posibilitan la clasificación de las concentraciones polínicas resultantes de los muestreos. Dichas categorías facilitan la expresión gráfica de los resultados en mapas sobre la situación actual y una

posible previsión. De esta manera el usuario obtiene una mejor comprensión de la información generada. Con el establecimiento de las diferentes categorías polínicas se intenta homogeneizar la información aerobiológica en el territorio nacional, teniendo en cuenta los diferentes pisos bioclimáticos y unidades biogeográficas existentes.

En el establecimiento de los umbrales para definir las diferentes categorías se ha tenido en cuenta:

- a) el carácter anemófilo de la especie,
- b) el Índice Polínico Anual y
- c) su capacidad alergógena.

De acuerdo a estos factores, existen cuatro grupos que incluyen diferentes tipos polínicos, estando *Olea* incluido en el grupo 3 cuyas categorías de valores se dan en la tabla 6.4.

En el manual de calidad de la REA se indica que en ocasiones, y para algunos tipos polínicos en particular, han de establecerse categorías y umbrales de concentración polínica a nivel local o regional teniendo en cuenta los numerosos factores que condicionan su presencia: abundancia de la especie en una zona concreta, presencia de otras especies con las que puede establecer relación de reactividad cruzada, presencia de contaminantes atmosféricos, condiciones meteorológicas particulares, etc..., y que intervienen en la aparición de síntomas en las personas afectadas de polinosis. Por ello, se han analizado año tras año los valores umbrales de *Olea* expresados como granos/m³ durante el PPP estableciéndose 7 categorías de valores (Tabla 6.7):

- $N = 0$
- $0 < N \leq 10$
- $10 < N \leq 50$
- $50 < N \leq 100$
- $100 < N \leq 200$
- $200 < N \leq 500$
- $N > 500$

donde “N” es la concentración, y se han calculado el número días del PPP para cada año que se encuentran encuadrados en cada una de ellas. Para su mejor interpretación los valores se han presentado en forma porcentual (tabla 6.9), calculando el % días de cada año del PPP de *Olea* pertenecientes a cada categoría polínica umbral. Durante el periodo completo 2000-2007, el 69,90% de los días que constituyen el PPP de *Olea* se encuentran dentro de las categorías con niveles de entre 1 a 50 granos/m³, (42,57% entre 1 y 10 granos/m³). Niveles nulos se contabilizan un 18,49%; un 6,22% con valores entre 51 y 100; superiores a los 100 granos/m³ un 5,23% de los que tan sólo supera la cifra de los 500 granos/m³ el 0,17% del total, que corresponde a un único año, el 2006. En los años de periodo de polinización (PPP) más cortos se observa un porcentaje mayor de número de días con valores superiores a los 50 granos/m³ por el contrario en los años de PPP más largos es menor (Tabla 6.8 y Figura 6.10), aunque el valor pico máximo del periodo sea superior; este hecho se ha visto reflejado en un estudio en Sevilla realizado por Conde *et al*, 2002 durante los años 1991-2000 donde observa que con menores picos de máxima incidencia la polinización es más mantenida.

El valor umbral de *Olea* de 200 granos/m³, estimado como alto por el Manual de calidad de la REA, sólo se produce en el 1,59% de los días del PPP. Valores similares se obtienen en un estudio en Madrid y Aranjuez (Gutiérrez *et al*, 2000) en el que caracteriza el PPP de *Olea* y se establecen 5 categorías de concentraciones medias diarias para un periodo de estudio de 4 años.

La red aerobiológica de la Comunidad de Madrid, Red Palinocam, para expresar los rangos de niveles de polen utiliza criterios exclusivamente estadísticos. Para ello usan la base de datos aerobiológica histórica de cada tipo polínico (1995-2003) y calculan los percentiles 90, 95 y 99 para establecer los niveles bajos, medios, altos y muy altos. Calculados dichos percentiles para nuestra serie de datos *Olea* 2000-2007 (Tabla 6.5) los valores obtenidos son:

- Nivel bajo (P90) <53 granos/m³
- Nivel medio (P95): 53-99 granos/m³
- Nivel alto (P99): 99-243 granos/m³
- Nivel muy alto: >243 granos/m³

Con el mismo método, se han calculado los niveles umbrales para el resto de taxones que comparten el PPP de *Olea*, cuyos valores quedan reflejados en la tabla 6.14. Tal y como se observa en los resultados para algunos taxones como es el caso de Urticaceae los niveles bajos obtenidos de 34,6 granos/m³ con el tratamiento estadístico de los datos, arrojan un valor considerado generalmente en la bibliografía como muy sensibilizante en los pacientes atópicos, así en el manual de la REA dentro del grupo IV al que pertenece dicho taxón, un valor de >30 granos/m³ se clasifica como nivel umbral alto. Caso contrario sucede con los valores obtenidos para Chenopodiaceae-Amaranthaceae que alcanza valores muy superiores a los niveles establecidos como altos (>54 granos/m³) sobre todo en la estación otoñal. La discordancia entre estos valores y la clínica se produce, por que solo se consideran los índices polínicos atmosféricos de forma absoluta, pero el grano de polen, es una partícula biológica cuya presencia en la atmósfera depende de aspectos fundamentales como la fenología de la floración, la capacidad individual de cada planta para liberar el polen a la atmósfera y las variables meteorológicas (temperatura, humedad, radiación, vientos dominantes y pluviosidad) que afectan a su transporte y dispersión.

En el tratamiento estadístico no se contemplan otros aspectos relevantes como la sensibilización local de la población a cada taxón, su capacidad alergénica individual, predominio local y estacional del taxón, localización rural o urbana, contaminación atmosférica presente y tasa de prevalencia de enfermedades respiratorias en dicha área geográfica.

Referente a posibles discordancias con el establecimiento de las diferentes categorías polínicas por parte de la REA, no hay que olvidar que se intenta homogeneizar la información aerobiológica en el territorio nacional, pero a nivel regional o local esta información debe adecuarse a la realidad clínica existente en dicho territorio. Los efectos sobre la salud dependerán, además de los niveles polínicos, de la susceptibilidad individual de cada persona y de la actuación, combinada o no de otros factores individuales y ambientales.

Si utilizamos estos criterios que sólo tienen en cuenta el análisis estadístico, la información que se daría a la población sensible, es que durante el

70% de los días que *Olea* está en el aire que respiramos, existe un riesgo bajo de producir polinosis por dicho taxón. Creemos que con una población alérgica en nuestra zona sensible a *Olea* en un 60,02%, según datos clínicos, y altamente polisensibilizada se tienen que tener en cuenta otros criterios para adecuar dichos valores a la realidad de los pacientes y ofrecer una información local y regional más adecuada (tabla 6.6).

Es evidente que los síntomas clínicos de los pacientes son el reflejo de la exposición a numerosos alérgenos y que el nivel umbral de respuesta se ve afectado por la interacción entre ellos, lo que explica la dificultad establecer precisos umbrales de reactivación de los pacientes polisensibilizados cuando se estudia un tipo polínico que comparte su PPP con otros pólenes alérgicos (Subiza, 2004).

Un criterio que hemos estimado importante es el peso específico de dicho taxón en la carga alérgica atmosférica local, para ello uno de los aspectos analizados es su influencia en el cómputo total, tanto del polen anual recogido como durante su Periodo Principal de Polinización. Cuando comparamos ambos datos analizado en la serie de estudio se observan importantes diferencias. Cuando se habla de *Olea* como valor porcentual con respecto al polen total anual (Tabla 6.1), su presencia oscila entre un mínimo del 11,30% (2004) y un máximo de 24,74% (2001) con una media en el periodo del 13,44%. Cuando analizamos la importancia de *Olea* año a año sólo durante su periodo principal de polinización (Tabla 6.10) con respecto al polen total acumulado en dicho periodo la presencia de *Olea* va desde un mínimo de 19,65% (2004) a un máximo del 40,61% (2001), con un valor medio en el periodo del 25% aproximadamente (tabla 6.10), lo que quiere decir que *Olea* representa uno de cada cuatro granos de polen que hay en el aire durante su periodo de floración. Ong *et al*, 1995, en un estudio sobre aeroalérgenos emitidos por la plantas indican que entre el 20 y el 30% de los granos de polen totales emitidos cada estación polínica son pólenes alérgicos y que en dicho periodo siempre destaca el tipo polínico dominante. Un aeroalérgeno tiene importancia clínica cuando reúne estas dos condiciones: poseer grupos antigénicos específicos capaces de provocar respuesta de hipersensibilidad en el hombre y encontrarse en el aire en concentraciones suficientes para provocar la

respuesta inmunológica (Negrini, 1992) (Guidos *et al*, 2005). Al comparar los datos se puede observar la diferencia clara de representación de dicho taxón cuando se refiere al total anual o cuando se limita a su estación de floración, variando así su influencia alergógena dependiendo del periodo en estudio.

Estos resultados y reflexiones nos hacen proponer nuevas categorías polínicas umbrales de *Olea* a nivel local o regional, más acordes a nuestra realidad aerobiológica, en lo que se refiere a su capacidad alergénica atmosférica que incluye los datos en la tabla 6.6:

- Nivel nulo 0 granos/m³
- Nivel bajo Entre 1 y 10 granos/m³
- Nivel medio Entre 11 y 50 granos/m³
- Nivel alto Entre 51 y 100 granos/m³
- Nivel muy alto Mayor de 100 granos/m³

Otra razón que nos confirma en proponer estos valores, está basada la variabilidad geográfica de niveles umbrales de *Olea* referidos en la bibliografía consultada. Los índices polínicos de *Olea* capaces de producir sensibilización en los pacientes difiere de unas regiones a otras dependiendo de distintas variables como son, la susceptibilidad individual del umbral de reactivación de los pacientes, nivel de exposición ambiental al polen de olivo, variabilidad botánica de especies (perfil antigénico de los olivares) o tolerancia genéticamente determinada (Feo, 2003). Así en Ciudad Real, en un estudio clínico realizado por Feo Brito, se indica que es necesaria la presencia en el aire de medias semanales de 153 granos/m³ al inicio de la floración para reactivar a los pacientes monosensibles bajando a 34 granos/m³ en su finalización. En Jaén, el umbral de reactivación es mucho más alto, de 400 granos/m³ para la mayoría de los pacientes debido al nivel alto de exposición de la población andaluza. Es necesario realizar estudios que comparen síntomas con niveles polínicos para determinar claramente la implicación clínica de los diferentes tipos polínicos alergénicos en cada ciudad así como para establecer los niveles umbrales de reactivación (Feo, 2003).

Según el informe alergológica 2005, el 40% de los pacientes alérgicos en España está polisensibilizado, lo que hace que los síntomas se alarguen en el tiempo y sufran asma alérgico un 20% de los mismos. El elevado porcentaje de polisensibilización en pacientes alérgicos a *Olea* ha sido referido en numerosos trabajos, llegando a alcanzar cifras del 80% (Chaparro *et al*, 1999) (Conde *et al*, 2002) (Quiralte *et al*, 2002) al igual que en nuestra región (Negro *et al*, 2004) donde la polisensibilización es alta. Este hecho, así como la posibilidad de existencia de reactividad cruzada con otros taxones alergénicos presentes en Cartagena, nos ha llevado a estudiar qué otros tipos polínicos de importancia clínica comparten el periodo principal de polinización PPP de *Olea* (tabla 6.11).

En la figura 6.11 se ha representado con una celda de color igual que *Olea* aquellos taxones que coinciden plenamente en sus PPP, de ellos es importante destacar la presencia de Poaceae, las gramíneas, ya que según el informe Alergológica 2005 es el polen que produce el 34,8% de las rinoconjuntivitis alérgicas, y el segundo taxón en importancia como causa de rinoconjuntivitis en Murcia (Miralles, 2009). Los taxones de importancia durante el PPP de *Olea*, por su índice polínico o por su capacidad alergénica son: Chenopodiaceae-Amaranthaceae (Chen), *Palmae* (Palm), *Plantago* (Plan), Poaceae (Poa), *Quercus* (Quer), *Rumex* (Rume), Urticaceae (Urti) y *Zygophyllum* (Zygo). Podemos observar como algunos de estos tipos polínicos comparten íntimamente el PPP de *Olea*, ya que las cantidades totales anuales y las del PPP de *Olea* son muy similares, este hecho se da en *Palmae*, *Plantago*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex* y *Zygophyllum*. Aún encontrando un número importante de granos de polen en el PPP de *Olea* cabe destacar otro comportamiento para Urticaceae y Chenopodiaceae-Amaranthaceae. La primera es un taxón que está presente todo el año aunque sus mayores recuentos polínicos se registran en la primavera coincidiendo con el PPP de *Olea*, mientras que para la segunda, la mayor concentración de granos de polen se encuentra fuera del PPP de *Olea*. Chenopodiaceae-Amaranthaceae presenta dos floraciones bien diferenciadas en Cartagena (tabla 6.13), la primera floración, menos intensa y primaveral, es la coincidente con el PPP de *Olea*, mientras que la segunda, es otoñal y en ella se

registran los recuentos mayores, que se van viendo en nuestra atmósfera en el transcurso de los años.

Un aspecto a destacar es que el conjunto de los taxones de importancia en el PPP de *Olea*, representan frente al total anual de polen un porcentaje que supera para el conjunto del periodo analizado más del 50% de los granos de polen recogidos. El menor valor lo tenemos para el año 2005, con un 36,26% y un PPP de 44 días, pero hemos indicado que el captador estuvo averiado en primavera, habiéndose perdido las lecturas entre el 1 de abril y el 10 de mayo, afectando totalmente a las floraciones de estos taxones. Para el resto de los años encontramos valores que oscilan entre el 43,40% del año 2000, con una duración del PPP en días de 70, al 60,33% del año 2001 con una duración del PPP de 76 días. En otras palabras, en un periodo de tiempo que oscila entre 60 y 106 días se recogen, en tipos polínicos representativos y de importancia en alergia, sobre el 50% del total anual, por lo que tenemos en pocos días una gran acumulación de floraciones y una carga alérgica total importante.

Indudablemente, en estas condiciones se pueden dar fenómenos de reactividad cruzada o sinergia alérgica, en las figuras 6.12 a 6.19 se han representado las concentraciones acumuladas de estos taxones, y se han indicado el orden decreciente de concentración. En los años 2001 y 2004 el orden es:

Olea > *Quercus* > Urticaceae > Poaceae > Chenopodiaceae-Amaranthaceae > *Zygophyllum* > *Palmae* > *Plantago* > *Rumex*. En los años 2000, 2003 y 2006 el orden es muy similar, la única diferencia es que *Quercus* presenta niveles más bajos, situándose por detrás de Poaceae. El año 2007, presenta mayores niveles Poaceae que Urticaceae. En todos estos años los mayores recuentos se obtienen para *Olea*. En el año 2002, los mayores recuentos son de *Quercus*, seguidos de *Olea*, Poaceae y Urticaceae. En 2004, los mayores recuentos se obtiene de Urticaceae, que supera en este caso a *Olea*, siguiendo el resto de los taxones el orden especificado para los años 2000, 2003 y 2006.

Cuando se analizan las correlaciones de *Olea* con el resto de taxones influyentes durante su PPP en el periodo en estudio 2000-2007 se observa una correlación bilateral positiva al 99% ($p < 0,001$) entre *Olea*, y la mayor parte de los

taxones (salvo para *Plantago* que lo es al 95% y *Palmae*) y el polen total acumulado durante el PPP (tabla 6.16). Cuando se realizan dichas correlaciones para los valores acumulados totales anuales en el periodo en estudio 2000-2007 (tabla 6.17) la correlación de *Olea* y el resto de taxones es positiva y significativa al 99%, y con valores mayores del coeficiente de correlación, salvo para *Chenopodiaceae-Amaranthaceae*, con la que se pierde la significación. Para los recuentos totales, se mantiene la significación, pero disminuye el coeficiente de correlación. Estos datos nos indican que para los taxones que comparten el PPP con *Olea* los datos fuera de este periodo son insignificantes, de manera que abundan los días en que ambos valores son nulos, produciendo el incremento del coeficiente de correlación o de la significación de este en los datos globales. Por el contrario, cuando fuera del PPP hay valores importantes, bien por floraciones específicas o por ser el dato el resultado del conjunto de granos de polen presentes en la atmósfera, la correlación baja en los datos globales frente a los del PPP, como ocurre en *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* y los totales. Por lo que nuevamente debemos señalar la importancia que tiene en estos estudios el centrar el análisis de los datos en los momentos de floración del tipo polínico que se estudia y la correcta definición del PPP.

Como hemos indicado, *Olea* es el taxón predominante y más abundante durante su PPP a excepción del año 2002 que es superado por *Quercus* y el año 2004 por *Urticaceae*. La mayoría presentan sus valores máximos junto a *Olea*, siendo taxones de polinización exclusiva o mayoritariamente primaveral que comparten el mismo PPP, como son *Palmae*, *Plantago*, *Poaceae*, *Quercus*, *Rumex* y *Zygophyllum*. Otros taxones que tienen más de un periodo de polinización pueden presentar sus niveles máximos junto a *Olea* en la primavera, como es el caso de *Urticaceae*, o tener su valor máximo en otro periodo anual como es el caso de *Chenopodiaceae-Amaranthaceae* que lo presenta en la época otoñal.

La presencia de diferentes géneros o especies dentro de un tipo polínico con distintas características fenológicas, que ocasiona diferentes floraciones, las condiciones atmosféricas locales o la introducción de plantas de otras áreas geográficas, que pueden dar lugar a floraciones extemporáneas, son la razón de que en algunos casos se puedan definir 2-3 periodos claros de polinización. En

Cartagena (tabla 6.13) los taxones con más de un periodo de polinización son Cupressaceae, Pinaceae, Urticaceae, Chenopodiaceae-Amaranthaceae y *Artemisia* (Elvira-Rendueles, 2001).

Olea representa en su PPP el 25,46% (Tabla 6.12) siendo el taxón dominante en este periodo, mientras que para el cómputo anual supone un 13,35%. Este es un aspecto importante, ya que en muchos casos se realiza la evaluación de la representatividad de un taxón en el cómputo anual, cuando su contribución a la carga alérgica total en el periodo de su floración puede ser mucho mayor. Hecho que ya hemos puesto de manifiesto en anteriores trabajos en los que valoramos la capacidad alérgica de *Zygophyllum fabago* (Belchi *et al*, 2001).

La presencia en la atmósfera durante el PPP de *Olea* de otros tipos polínicos alérgicos es importante desde el punto de vista clínico epidemiológico. En un estudio realizado en Ciudad Real (Feo, 1998) con 81 pacientes afectados de rinoconjuntivitis estacional, con el 50,7% de los pacientes sensibles a gramíneas más olivo y el 25% sensibilizados al polen de las quenopodiaceas, se observó que se producía una disminución de la reactividad de los pacientes alérgicos a *Olea* desde valores umbrales de *Olea* de 153 granos/m³ a primeros de mayo a 53 granos /m³ durante el mes de junio donde el análisis estadístico obtenía la relación más estrecha entre el polen de Olivo y las gramíneas. En la mayoría de los trabajos se indica una estrecha reactividad cruzada entre los diferentes géneros de la familia de las Oleáceas (Bousquet *et al*, 1985) (Negrini, 1992) (de Linares *et al*, 2007), pero también se ha descrito con otras especies no relacionadas filogenéticamente, como las gramíneas: *Lolium perenne*, *Artemisia Vulgaris* y *Betula verrucosa* (González *et al*, 2000). En el caso de las gramíneas la causa no es siempre la presencia de antígenos comunes, sino la aparición de sintomatología simultánea a ambos taxones en pacientes polisensibilizados, como puede ser nuestro caso donde ambos taxones comparten el PPP. Sin embargo, González *et al*, 2000 también han descrito un alérgeno minoritario de alta movilidad común a *Olea europaea* y a algunas especies de gramíneas como *Lolium perenne*, *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense* y *Phragmites communis*.

Otro aspecto que queremos resaltar es el de la familia Chenopodiaceae-Amaranthaceae (tabla 6.13), que representa el 22,29% en el cómputo anual del polen total en el periodo de estudio, cifra que desciende al 8,55% del polen durante el PPP de *Olea*, es decir, dicho taxón presenta sus máximos valores fuera de este periodo de tiempo, lo que tiene importancia desde el punto de vista de capacidad alergénica atmosférica ya que nos referimos al taxón mayoritario en dicho periodo de estudio y segundo polen en importancia por su carácter alergénico reconocido en nuestra zona, sobre todo en la costa (Miralles, 2009); por ello, aunque la presencia de Chenopodiaceae-Amaranthaceae durante el PPP de *Olea* sea muy inferior, en comparación con la existente en la estación estival-otoñal, no debe ser infravalorada dada la alta sensibilización de la población murciana a dicho tipo polínico. Se ha descrito cierta reactividad cruzada entre el polen de *Olea europaea* y *Chenopodium album*, tanto in vitro como in vivo, en pacientes alérgicos al olivo que están poco expuestos a las quenopodiaceas ya que pertenecen a zonas geográficas con niveles polínicos atmosféricos muy bajos y con pruebas cutáneas positivas en el 88% de los casos (Conde *et al*, 2002).

Han sido descritas crisis de asma alérgico con recuentos de polen bajos y poca correlación entre nivel de alérgenos y recuentos de polen (Beggs, 1998). La existencia de una actividad alergénica significativa durante los periodos previos y posteriores a la polinización ha sido ampliamente demostrada, para diversos alérgenos (Pehkonen *et al*, 1994) (Spieksma *et al*, 1995) (Schäppi *et al*, 1996), donde se afirma que puede haber carga alergénica en partes de las plantas diferentes a los granos de polen tales como raíces, corteza o pétalos de flor, o que los alérgenos pueden ser resuspendidos de tales partículas después de su deposición en el suelo. También se apunta a la posibilidad de reacciones cruzadas con otros tipos de polen (Pehkonen *et al*, 1994).

De Linares *et al*, 2007, en un estudio realizado en Granada comparan la actividad alergénica atmosférica del alérgeno Ole e 1 en muestras recogidas con un impactador en cascada con los recuentos polínicos de *Olea* mediante la metodología de Hirst, presentan resultados que evidencian una elevada actividad alergénica de Ole e 1, al inicio y término de la estación polínica cuando los recuentos del polen de olivo son bajos. En estos periodos anteriores o posteriores

al periodo principal de polinización coincide con la presencia de otros granos de polen alergénicos, cuyos alérgenos presentan una cierta homología con Ole e 1 como son los de *Lolium* (Lol p 1) *Plantago* (Pla ℓ 1) y *Chenopodium* (Che a 19). Se ha comprobado la presencia de un pico en los niveles polínicos de *Plantago* al inicio de la floración de *Olea* que pudieran justificar este hecho pues su alérgeno Pla ℓ1 presenta una homología entre el 30 y 40% con Ole e 1, además el nivel alto de alérgeno aparece en el plato del impactador donde se recogen las partículas de mayor tamaño que incluye el polen intacto. Los niveles altos de alérgeno con recuentos de polen bajo producidos al final de la estación, coinciden con valores de alérgeno alto en el plato donde se recogen las partículas paucimicrónicas de <1 µm que hacen suponer fenómenos de resuspensión atmosférica. En Cartagena *Plantago* representa el 6,56% del polen total durante el periodo de polinización de *Olea*.

La familia Urticaceae (figuras 6.11) a la que pertenece uno de los géneros más alergénicos en la zona mediterránea, *Parietaria*, tiene un periodo de polinización mucho más amplio que *Olea*, su porcentaje en el PPP de *Olea* es del 16,62% un poco superior al cómputo anual 13,07% (Tabla 6.12), dado que está presente casi todo el año, aunque sus valores máximos se centran en la primavera. Habría que saber si los contajes de especies alergénicas de *Parietaria* se centran sólo en este periodo o fuera de él, para lo cual se aconseja la cuantificación de su proteína alergénica durante dicho periodo. *Parietaria* es el 4º taxón más alergénico en nuestra zona afectando al 39,06% de la población alérgica (Negro *et al*, 2004). Se han descrito (Beggs, 1998) ataques de asma alérgico tras tormentas debido a la rotura osmótica del grano de polen de gramíneas y la salida de su contenido alergénico en forma de partículas paucimicrónicas, fácilmente respirables. D'Amato *et al*, 2005, en un trabajo sobre asma alérgico y factores ambientales refieren este mismo hecho en Nápoles, donde se ingresan 7 pacientes por crisis de asma alérgico con historial de rinitis alérgica por *Parietaria*. El hecho sucede en primavera tras un episodio de tormentas, al principio del mes de junio cuando se alcanzan valores pico de *Parietaria* y los niveles de contaminación atmosférica no eran elevados (en anteriores trabajos en Nápoles

habían referido crisis asmáticas en pacientes alérgicos a *Parietaria* con niveles altos de contaminación atmosférica fundamentalmente debida al ozono).

Como hemos ido apuntado, una serie de hechos han condicionado la necesidad de avanzar en otras direcciones en los estudios aerobiológicos.

1.- Se está observando un aumento de la morbilidad por enfermedades alérgicas asociadas a granos de polen, sobre todo en las zonas urbanas de los países industrializados (D'Amato, 2002) (D'Amato *et al*, 2002).

2.- Muchos estudios han puesto también de manifiesto que la relación entre el número de granos de polen y la sintomatología alérgica no es siempre muy alta (Beggs, 1998).

3.- Se han detectado en el aire partículas polínicas alergénicas, pero de menor tamaño que los granos de polen, tanto antes como durante y después del periodo de polinización (Busse *et al*, 1972) (Solomon *et al*, 1983) (Knox, 1993) (Ranthio-Lehtimäki *et al*, 1994) (Pehkonen *et al*, 1994) (El-Ghazaly *et al*, 1995) (Spieksma *et al*, 1995) (Spieksma *et al*, 1999) (Vinckier *et al*, 2001), así como la presencia de aeroalérgenos en estructuras vegetales distintas del grano de polen (Fernández-Caldas *et al*, 1989) (D'Amato *et al*, 1991) (Takahashi *et al*, 1991).

4.- Se ha acuñado el término carga alergénica del aire (Suphioglu, 1998) (Shäppi *et al*, 1999) (Wickman, 2005) y parece más lógico medir alérgenos que granos de polen.

5.- Las dimensiones de las fracciones alergénicas van desde 0,1 a 2,5 μm , es decir, en el rango de tamaño más eficaz para entrar a las regiones profundas de las vías respiratorias.

Así, ya en 1994, Ranthio-Lehtimäki *et al*, escribieron: “estos hechos demandan nuevos esfuerzos a los aerobiólogos, no sólo contar partículas en las muestras, sino desarrollar nuevos métodos para la cuantificación de la carga alergénica actual en el aire”.

En este contexto general, nos propusimos desarrollar un trabajo de investigación en el que se estudiaran las proteínas responsables de las respuestas

alérgicas, tanto en el propio grano de polen como su presencia en el aire. Este proyecto surgió en 1996 y está coordinado por la Dra. Suárez-Cervera de la Universidad de Barcelona. Nuestro grupo de trabajo se ha encargado de la identificación y cuantificación de los aeroalérgenos y desde el año 2006 participa en grupos de investigación de la Universidad de Vigo y de la de León. Colabora como promotor-observador en la realización del estudio el Departamento de I + D de los laboratorios farmacéuticos Bial-Aristegui. Esfuerzos en este sentido se realizan por variados grupos de investigación, se puede destacar el proyecto Monalisa, dentro del Programa Europeo Life Environment (Thibaudon *et al*, 2008).

La razón por la que muchos autores estudian, o aconsejan estudiar, el contenido alergénico en las fracciones pequeñas del bioaerosol radica en explicar los síntomas del asma alérgico, ya que consideran que los granos de polen íntegros son demasiado grandes para alcanzar las vías respiratorias inferiores. El que los alérgenos puedan estar presentes en las fracciones pequeñas del aerosol (Busse *et al*, 1972) (Solomon *et al*, 1983) (Agarwal *et al*, 1984), facilitaría, para estos autores, la explicación de la etiología del asma alérgico. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la rápida elución de proteínas alergénicas en ambientes acuosos hipotónicos e isotónicos (Casas *et al*, 1996) (Grote *et al*, 1999) (Castells *et al*, 2002) (Suárez-Cervera *et al*, 2003) (Morales, 2008). Estas proteínas juegan un papel fundamental en el reconocimiento polen-estigma y se han encontrado en pocos minutos de iniciarse la germinación normal de los granos de polen (Suárez-Cervera *et al*, 2005). En casos de germinación abortiva, los tubos polínicos pueden romperse liberando partículas micrónicas y submicrónicas, en el rango de tamaño de la fracción respirable, que contienen las proteínas alergénicas (Grote *et al*, 2003). El grano de polen que llega a las mucosas del tracto respiratorio superior se encuentra un ambiente acuoso, con un grado de humedad y temperatura adecuados para favorecer el proceso de germinación normal y abortiva.

En este sentido, debemos señalar que la eficiencia en la deposición de partículas en el tracto respiratorio del ser humano difiere de modo importante entre individuos. Las fluctuaciones existentes entre diferentes individuos se

denominan variabilidad interpersonal, que puede estar relacionada con parámetros morfológicos y fisiológicos (Hofmann *et al*, 2002), incluyendo la estructura y la geometría de las vías aéreas, así como la profundidad, velocidad y modo en el que se realiza la respiración (no es lo mismo respirar por la nariz que hacerlo por la boca). Algunas de las partículas inhaladas son exhaladas sin depositarse en el tracto respiratorio, el diámetro aerodinámico teórico para que la deposición sea mínima es de $0,5\ \mu\text{m}$. En general, para partículas con diámetros aerodinámicos equivalentes, mayores de $0,5\ \mu\text{m}$ y menores de $10\ \mu\text{m}$, un incremento de la talla se asocia con una mayor deposición pulmonar, mientras que para partículas con diámetros menores de $0,5\ \mu\text{m}$ la deposición se incrementa de modo inversamente proporcional al tamaño de la partícula (ARB/OEHHA, 2001). Para que las partículas ya depositadas sean exhaladas se requiere su resuspensión en el flujo de aire. Esta resuspensión es, de hecho, usada en la administración de formas farmacéuticas para el tratamiento del asma bronquial, que permite la administración de principios activos de modo inhalable. Las partículas del principio activo se resuspenden en la corriente de aire durante la inhalación, de tal manera que pueden alcanzar los pulmones, mientras que las partículas del excipiente, de mayor tamaño, serán deglutidas (Podczek, 1999). Por ello, nosotros pensamos que aunque los granos de polen sean demasiado grandes para alcanzar en cantidad importante la vías respiratorias inferiores, es posible que las proteínas liberadas allí durante su germinación, normal o abortiva, sean resuspendidas. Estas proteínas con tamaños micrónicos y submicrónicos, podrían penetrar profundamente hasta los alveolos pulmonares. Por otro lado, al ser muy solubles, pueden disolverse en los fluidos extracelulares que revisten las vías respiratorias, y en consecuencia ser transportadas dentro de las células epiteliales u otras células del tracto respiratorio (ARB/OEHHA, 2001).

Po lo tanto, nosotros consideramos al grano de polen el transportador primario de las proteínas alergénicas, ya que la importancia cuantitativa del resto de las aportaciones debe ser pequeña, o producirse de modo puntual, ante situaciones concretas, pero a la luz de todo lo dicho, hemos considerado una buena aproximación al problema desde la aerobiología la cuantificación de la carga alergénica presente en el bioaerosol para cada alérgeno principal de los tipos

polínicos reconocidos en una determinada área geográfica, con métodos simples y fiables que permitan entrar dentro del rango de sensibilidad de la técnica de cuantificación propuesta, obteniendo datos que tengan valor para los estudios epidemiológicos.

Se han realizado diversos esfuerzos en este sentido, tanto en lo relativo a la toma de muestra como en los métodos de cuantificación. De modo resumido podemos indicar que se han utilizado captadores tanto de alto volumen (Agarwal *et al*, 1981) (Spieksma *et al*, 1995) (Riediker *et al*, 2000), como de bajo volumen (Renstrom *et al*, 1997) (Solomon *et al*, 1983) (Yli-Panula *et al*, 1997), con fraccionamiento por tamaño de partícula; con impactadores en cascada (Spieksma *et al*, 1999), con el muestreador denominado SSBAS, especialmente diseñado para estos estudios por Kauppinen *et al*, 1989 (Pehkonen *et al*, 1994) (Rantio-Lehtimäki *et al*, 1994), o con filtración con tamaño de poro diferenciado (Solomon *et al*, 1983), o sin fraccionar el bioaerosol por tamaño, bien realizando el muestreo con captadores tipo Hirst de impacto activo (Schumacher *et al*, 1988) (El-Ghazaly *et al*, 1995), con captadores tipo ciclónico (Williams *et al*, 2001) (Takahashi *et al*, 2001), o por filtración (Acevedo *et al*, 1998). Al ser la fuerza impulsora de nuestro estudio la puesta en marcha de metodologías de cuantificación de aeroalérgenos que permitan complementar los recuentos tradicionales de granos de polen o incluso llegar a sustituirlos, nos pareció que de entre las diferentes opciones de muestreo posible, las máximas ventajas las tendría aquel método que recogiera, en principio, un volumen de aire similar al de la metodología más extendida en aerobiología y utilizada por nuestro grupo, el método de Hirst. Además, en la selección del método nos pareció fundamental conseguir una única muestra diaria, representativa de la carga alérgica total, mejor que un fraccionamiento por tamaño, que complicaba tanto el muestreo como la posterior cuantificación. Por ello, tras estudiar los aparatos disponibles en el mercado nos decantamos por el ciclón Burkard, al que nos hemos referido en materiales y métodos, para el cual se dispone de datos de eficiencia (Emberlin, 1995). Otra ventaja fundamental de este equipo es que recoge la muestra en fase sólida, en un tubo Eppendorf, con lo cual se facilita el manejo posterior de la misma.

En cuanto a las metodologías para la cuantificación de alérgenos, en primer lugar hay que preparar la muestra para la cuantificación, bien mediante la elución de los alérgenos (Agarwal *et al*, 1981 y 1984) (Rantio-Lehtimäki *et al*, 1994) (Pehkonen *et al*, 1995) (Yli-Panula *et al*, 1997), o mediante la transferencia a membrana, generalmente de nitrocelulosa (El-Ghazaly *et al*, 1995) (Yli-Panula *et al*, 1997). Para la cuantificación de los aeroalérgenos se han utilizado métodos inmunoanalíticos, bien mediante la visualización y cuantificación directa en filtros (Acevedo *et al*, 1998) (Holmquist *et al*, 1999) (Razmovski *et al*, 2000), cuantificación por Rast inhibición (Agarwal *et al*, 1981 y 1984) (Renström *et al*, 1997), revelado de las proteínas tras la transferencia (Yli-Panula *et al*, 1997) o mediante inmunobloting (Schumacher *et al*, 1988) (Takahashi *et al*, 1993) (Sakaguchi *et al*, 1995) o ELISA (Rantio-Lehtimäki *et al*, 1994) (Pehkonen *et al*, 1995) (Yli-Panula *et al*, 1997). También se han utilizado metodologías basadas en la PCR (Williams *et al*, 2001) (Calderon *et al*, 2002), o en la resonancia de plasmón superficial, BIACORE (Takahashi *et al*, 2001).

De las diferentes alternativas posibles, nos pareció la más adecuada la cuantificación de los aeroalérgenos por métodos inmunoquímicos, en concreto la cuantificación mediante ELISA doble sandwich, metodología que había sido puesta en marcha en los laboratorios de investigación de la empresa Bial Arístegui colaboradora del proyecto. Como hemos referido en materiales y métodos, las proteínas solubles son eluidas de la muestra (Moreno-Grau *et al*, 2006) y se realiza la cuantificación por una técnica enzimo inmuno analítica en dos pasos (Arilla *et al*, 2002 y 2006), utilizando como patrones eluatos obtenidos a partir de material de referencia.

Al inicio del estudio nos decidimos por cuantificar una profilina del polen de olivo, Ole e 2. Las profilinas, descubiertas en 1977 (Deviller, 1995), son proteínas ubicuas, de bajo peso molecular, que se han encontrado en células animales, vegetales e incluso en virus (Martínez *et al*, 2002). Las profilinas de las plantas, señaladas como alérgenos por primera vez por Valenta *et al*, 1991, han sido descritas como los alérgenos con mayor reactividad cruzada en un amplio rango de especies, próximas o alejadas y tejidos vegetales, lo que les ha valido el término de panalérgenos (Valenta *et al*, 1992) (Martínez *et al*, 2002) (Morales *et*

al, 2008). Las profilinas se ligan a los anticuerpos IgE en una proporción variable, que puede alcanzar al 20% de los pacientes con polinosis, desencadenando los síntomas de la alergia tipo 1 (Valenta *et al*, 1991, 1992, 1996). La presencia de profilinas y otras proteínas relacionadas con componentes alergénicos capaces de mostrar reactividad cruzada ha permitido explicar por qué ciertos pacientes muestran alergia del tipo I a determinados tipos polínicos y también a alimentos procedentes de plantas alejadas (Valenta *et al*, 1992). Por ello, en principio, parecía una buena estrategia la cuantificación de una profilina, como indicador de la carga alérgica del bioaerosol.

Las cantidades presentes en las muestras se encontraron la mayor parte de los días estudiados por debajo del límite de detección de la técnica enzimoimmunoanalítica. En la figura 6.22 puede observarse como en los días en los que se han encontrado niveles de Ole e 2 por encima del límite de detección de la técnica también se encuentran niveles importantes en los recuentos de *Quercus* y de Urticaceae. Todo ello nos llevó a replantear la elección de los aeroalérgenos a cuantificar, decidiendo en la campaña siguiente, año 2003, cuantificar Ole e 1, uno de sus alérgenos mayoritarios.

Como puede observarse en las tablas 6.22 a 6.26, se producen variaciones diarias en las concentraciones de granos de polen y de aeroalérgenos, pero como puede apreciarse en las figuras 6.23 a 6.27 la variación relativa de ambas concentraciones sigue comportamientos paralelos, como queda refrendado por la correlación positiva y significativa, salvo para el año 2007, encontrada entre ambas variables para los años de estudio. En general, podemos afirmar que en las muestras cuando se produce un incremento en los recuentos de granos de *Olea*, se produce también un incremento en las concentraciones de Ole e 1. Pequeños desajustes podemos observar en los años 2003, 2006 y 2007. En 2003 y 2006 la presencia de *Olea* se adelanta a la del aeroalérgeno, encontrando el valor máximo de los recuentos polínicos en la muestra anterior al máximo encontrado en el aeroalérgeno. La situación contraria se da en el año 2007, en el que el valor máximo del aeroalérgeno lo encontramos en la muestra anterior al máximo de los recuentos de *Olea*. En ninguno de los casos podemos señalar la presencia de un fenómeno meteorológico digno de mención. Aunque en el año 2003 se produce

una pequeña precipitación, en el periodo correspondiente a la muestra anterior al día en que se incrementa la concentración de *Olea* (cantidad recogida 0,6 mm), no se producen estas en los otros dos años.

Otro aspecto que queremos comentar es el de aquellas cuantificaciones en las que los valores relativos del recuento de granos de polen de *Olea* y el de aeroalérgeno se alejan, bien con mayores recuentos de granos de polen, años 2003 (muestras 39, 48, 53 y 54), 2004 (muestras 71 y 76), 2005 (muestras 160, 167 a 170), 2006 (muestra 147 y 152) y 2007 (muestra 348, 349, 353 a 357), o con mayores valores relativos de Ole e 1, años 2003 (muestra 48), 2004 (muestras 62 a 65, 67 69, 77 a 79), 2006 (muestras 138, 139, 148, 149) y 2007 (muestra 352). Algunos de estos desajustes coinciden con las muestras en las que el pico de *Olea* se adelanta o atrasa con respecto al de aeroalérgeno y que hemos comentado en el párrafo anterior. En los años, 2003 (muestras 39, 53 y 54), 2004 (muestra 71), 2005 (muestras 167 a 170), 2006 (muestra 152) y 2007 (muestra 349) los mayores valores relativos de *Olea* coinciden con la presencia de precipitaciones, de irregular cuantía. Sin embargo, en el resto de las muestras en las que se observa este comportamiento no se dan precipitaciones. Los mayores valores relativos de Ole e 1 en el año 2004 los encontramos en los periodos inicial y final del muestreo, en el inicial observamos una pequeña precipitación con la primera muestra, y también una nueva precipitación coincidente con la muestra 78; en el año 2006, hay una pequeña precipitación el día anterior al incremento relativo de la cantidad de aeroalérgeno en las muestras 138 y 139. Las condiciones meteorológicas, como la lluvia o la alta humedad relativa, han sido señaladas como factores que favorecen la elución de las proteínas alergénicas (Vega-Maray *et al*, 2006) y se ha indicado el incremento en la concentración de aeroalérgenos tras tormentas (Schäppi *et al*, 1999), la posibilidad de la ruptura del grano de polen por un choque osmótico (Knox, 1993) (D'Amato *et al*, 2008), con la liberación de material alergénico. También se ha indicado la posibilidad de que con el incremento de humedad, los granos de polen se depositen, liberen las proteínas, y posteriormente, se sequen, pudiendo ser resuspendidos estos materiales, incrementando nuevamente la carga alergénica (Rantio-Lehtimäki *et al*, 1994).

En los últimos años se vienen haciendo importantes esfuerzos por conocer de modo adecuado los diferentes alérgenos del polen de *Olea*. Saber la composición alergénica permitirá entender los mecanismos relacionados con el desarrollo de la polinosis (Quiralte *et al*, 2007). La cantidad de alérgeno extraíble por unidad de peso del material de partida varía enormemente (Brasó *et al*, 2003) en función de su origen, hecho que dificulta la estandarización de los extractos en unidades de masa y que afecta tanto a la reproducibilidad de las pruebas diagnósticas como al tratamiento de las enfermedades alérgicas. Este mismo problema lo tenemos al realizar las extracciones para la cuantificación de los aeroalérgenos. Se ha comprobado que las plantas sometidas a diferentes condiciones pueden producir mayor o menor cantidad de proteínas alergénicas (Suárez-Cervera *et al*, 2008), en el caso de *Olea* la procedencia de diferentes cultivares también da lugar a diferencias en la cantidad de Ole e 1 que produce el grano de polen y del polimorfismo de Ole e 1 (Hamman-Khalifa *et al*, 2008). Este sería un aspecto a considerar, si a lo largo de la estación polínica las diferentes procedencias de los granos de polen pueden dar lugar a variaciones en la capacidad productora de alérgenos y diferentes niveles. También encontramos que los valores absolutos de la cuantificación de los aeroalérgenos varían entre los años estudiados, así para 2003 y 2004, no se superan los 1000 pg/m³, mientras que para 2005, 2006 y 2007 se superan estos valores, alcanzando los 5182 pg/m³ en 2005, los 2752 pg/m³ en 2006 y 3519 pg/m³ en 2007, mientras que los valores más altos para cada uno de los años de los recuentos de *Olea* calculados para el muestreo de los aeroalérgenos han sido de 181; 45; 111; 323 y 173 granos/m³, respectivamente. Hecho que consideramos está asociado a la dificultad de precisar las concentraciones de alérgeno en los extractos que se utilizan como patrones en las metodologías inmunoquímicas, directamente en relación con la dificultad de estandarización de los mismos.

El comportamiento en el año 2007 difiere del encontrado en el resto de los años, no sólo para la relación entre los recuentos de *Olea* y la cuantificación de Ole e 1, sino también de la relación existente entre los recuentos de *Olea* y el conjunto de los granos de polen presentes en la atmósfera de Cartagena, que aún siendo positiva, pierde la significación estadística (tabla 6.24), compárense estos

valores de las correlaciones con los aportados en las tablas 6.16. y 6.17, para el PPP de *Olea* o el año completo, con coeficientes de correlación de 0,801 y 0,582, significativos en ambos casos al 99%. Consideramos que al seleccionar los días en los que se ha cuantificado aeroalérgeno se han dejado fuera del análisis una parte importante del Periodo Principal de Polinización de *Olea*, en un año en el que la floración ha sido más extensa, y que presenta el mayor de los PPP de los años de estudio.

Otro aspecto a destacar está relacionado con el muestreo. Mientras que la metodología Hirst nos permite tener datos diarios de las concentraciones de los diferentes tipos polínicos, y los días comprenden desde las 0 horas a las 24, es decir, son días naturales completos, en el método utilizado, el captador ciclónico Burkard, el muestreo es manual, lo que obliga a acudir al captador con carácter diario, lo que en ningún caso se realiza a las 24 horas del día, y, en nuestro caso, nos ha obligado a acumular las muestras en los días festivos, por lo que las fechas de muestreo que se recogen en las tablas 6.18 a 6.23 recogen periodos variables. Para poder comparar los valores de ambos muestreos, se han reanalizado los recuentos de granos de polen para los periodos de tiempo muestreados con el Burkard, pero al acumular días, los picos resultan diluidos, es decir, los valores medios de periodos de tiempo superiores a 24 horas son menores que los valores del día pico. Así, por ejemplo, para el año 2007 el día pico se tuvo el 26 de mayo, con un valor de 311 granos/m³ (tabla 6.2), ese día se muestreó dentro de la muestra 353 en el muestreo Burkard, que va del 25 al 28 de mayo, dando lugar a un valor total de 173 granos/m³.

Para los años 2003 y 2004 se han encontrado los mejores paralelismos entre el comportamiento de los recuentos de los granos de polen y los de aeroalérgeno. El número de muestras analizadas en los años estudiados han sido similares, salvo para el año 2007 en el que solo se cuantificaron aleroalérgenos en 12 muestras, el resto de los años se han cuantificado desde 22 muestras en el año 2004 a 29 en 2006. Las cuantificaciones de aeroalérgenos que recogen la información más relevante del PPP son las de los años 2003, 2004 y 2006, encontrándose para este último año las tres últimas muestras fuera del PPP definido en esta memoria.

El análisis global de los datos aportados en esta memoria, en la que hemos comprobado que las concentraciones de granos de polen de *Olea* en nuestro bioaerosol no son muy elevadas, hemos indicado que son inferiores a las encontradas en las zonas más al sur de la Península Ibérica, y mayores que las de áreas geográficas más al norte (Antepara *et al*, 1995) (Belmonte, 1988) (Trigo, 1998) (Alba *et al*, 2002) (Alcázar *et al*, 2002) (Recio *et al*, 2002) (Rodríguez *et al*, 2002), con recuentos globales muy por debajo de los referenciados en los puntos de muestreo vinculados a la red Española de Aerobiología, que cubren gran parte de la geografía de nuestro país, y que nos llevaron a afirmar que nuestra zona se caracterizaba por una baja intensidad polínica con presencia de numerosos taxones diferenciados (Elvira-Rendueles, 2001), teniéndose constancia de la importancia de la polinosis en nuestra Región, y el papel destacado de *Olea* como agente causal (Negro *et al*, 2004), y la coincidencia en el tiempo de su PPP con el de otros taxones relevantes desde el punto de vista de la polinosis, nos lleva a pensar que en nuestra zona la polisensibilización es un factor esencial en las manifestaciones clínicas en nuestra área y que la homología existente entre diferentes alérgenos como *Plantago* (Pla ℓ 1), *Lolium* (Lol p 1) y *Chenopodium* (Che a 1) (Lombardero *et al*, 2002) conducen a que la carga alérgica total sea importante, aún cuando los valores cuantitativos de cada uno de los taxones presentes no alcancen la importancia de los referidos en otros lugares. Sería también importante profundizar en la capacidad reactiva de los granos de polen de las plantas de nuestro entorno, ya que muchos de los alérgenos son proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-proteins), que forman parte del sistema de defensa de las plantas (Chen *et al*, 1999) (Suárez-Cervera *et al*, 2008).

Las plantas tras ser expuestas a agentes biológicos (Van Loon 1985, 1997), físicos y químicos (Legrand *et al*, 1987) agresivos, desarrollan una respuesta que origina una síntesis de nuevas proteínas específicas, estas proteínas, como hemos indicado, se denominan PR, estas proteína cumplen una serie de propiedades, así se extraen de modo selectivo a bajos pH, son altamente resistentes a los enzimas proteolíticos, se localizan predominantemente en los espacios intercelulares y pueden ser separadas con facilidad por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones originales (Van Loon, 1985) (Legrand *et al*, 1987). Se han encontrado

diferencias significativas entre la producción de Cup a 3, una proteína de este tipo, en granos de polen maduros e hidratados recogidos en árboles de zonas no contaminadas, frente a los recogidos en zonas contaminadas, (Suárez-Cervera *et al*, 2008), habiéndose señalado que la expresión de esta proteína bajo condiciones de contaminación está directamente relacionada con la alergenicidad del grano de polen (Cortegano *et al*, 2004).

La contaminación ocasionada por las industrias y el tráfico rodado es uno de los factores que puede estar contribuyendo al incremento de las alergias y del asma (London *et al*, 2002) (Molina, 2002). Se considera que las partículas originadas en la combustión de los motores diesel, constituidas por carbono que puede contener adsorbido o condensado hidrocarburos, derivados de los hidrocarburos, compuestos sulfurados y otros compuestos (Morawska *et al*, 2002), por lo que podrían ligar sustancias tóxicas o alergénicas, sirviendo de vehículo para su entrada en el aparato respiratorio. Por otro lado, si la propia contaminación puede incrementar la producción de alérgenos, nos vamos a encontrar con diferentes capacidades de respuesta de unas zonas a otras. Esto podría justificar el hecho de que en Cartagena, con bajos niveles polínicos, se tengan altas prevalencias de polinosis (Negro *et al*, 2008) y asma (ISAAC, 1998) (Carvajal-Urueña *et al*, 2005).

Por todo ello, resulta esencial determinar para cada área geográfica concreta la evolución de las concentraciones de los taxones más representativos desde el punto de vista tanto de su cantidad como de sus efectos para, cuando se han obtenido series temporales suficientemente extensas, analizar desde un punto de vista estadístico su comportamiento y poder definir tanto su Periodo Principal de Polinización, como los valores umbrales a considerar en la información aerobiológica suministrada, para que sea realmente de utilidad para las personas afectadas, y los valores incorporados en la información polínica se corresponda con la sintomatología real que el paciente experimenta, complementando la información relativa a los niveles polínicos con la evaluación de los aeroalérgenos presentes en el bioaerosol.

8. CONCLUSIONES

8. Conclusiones

1. El estudio aerobiológico del tipo polínico *Olea* en Cartagena define su periodo principal de polinización, PPP, dentro de la estación primaveral, siendo para el periodo estudiado 2000-2007, el taxón predominante con un valor medio del 25,46% del polen recolectado, lo que en otras palabras significa que *Olea* representa uno de cada cuatro granos de polen presentes en el aire durante su periodo de floración.
2. El elevado porcentaje de polisensibilización en pacientes alérgicos a *Olea* nos ha llevado a estudiar qué otros tipos polínicos de importancia clínica comparten su periodo principal de polinización. Destacan por su índice polínico o por su capacidad alergénica los tipos Chenopodiaceae-Amaranthaceae, *Palmae*, *Plantago*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex*, *Urticaceae* y *Zygophyllum*. De ellos, *Palmae*, *Plantago*, Poaceae, *Quercus*, *Rumex* y *Zygophyllum* comparten plenamente el PPP de *Olea*, ya que las cantidades totales anuales y las recogidas en el PPP de *Olea* son muy similares. *Urticaceae* está presente todo el año aunque sus mayores recuentos se registran en la primavera, coincidiendo con el PPP de *Olea*. Chenopodiaceae-Amaranthaceae presenta dos floraciones bien diferenciadas en Cartagena, la primera floración, menos intensa y primaveral, es la coincidente con el PPP de *Olea*, mientras que la segunda, es otoñal y en ella se registran los recuentos mayores.
3. El polen de *Olea* representa el 13,35% del computo anual total, valor que pasa al 25,46% en el PPP y sumado con el resto de taxones que comparten su PPP se recoge en ese periodo de tiempo el 50% del polen total anual. Esto se traduce en que en un periodo de tiempo relativamente corto que oscila entre los 60 y 106 días se produce una gran acumulación de floraciones y una carga alergénica importante. Por ello, consideramos que el conocimiento del aporte de cada taxón a la carga alergénica local durante su periodo principal de polinización, PPP, es esencial para la comprensión de la polinosis y su adecuado control.

4. Dentro de la Red Española de Aerobiología, Cartagena es de las estaciones de muestreo que registra uno de los contajes anuales de polen más bajos. La Región de Murcia, según el último informe publicado por la SEIAC, Alergológica 2005, se sitúa en la máxima prevalencia de rinoconjuntivitis y asma alérgico, siendo *Olea* el segundo taxón en importancia, tras el polen de las gramíneas. Esta aparente contradicción, bajos recuentos de los tipos polínicos y alta prevalencia de enfermedad alérgica en la zona se justifica desde el punto de vista aerobiológico por la existencia de una gran biodiversidad de especies alergénicas que comparten el PPP de *Olea*, incrementando la carga alergénica global.
5. La realidad aerobiológica y clínica de *Olea* en nuestra zona nos lleva a proponer nuevas categorías umbrales para los niveles polínicos:
 - i. Nivel nulo 0 granos/m³
 - ii. Nivel bajo 1-10 granos/m³
 - iii. Nivel medio 11-50 granos/m³
 - iv. Nivel alto 51-100 granos/m³
 - v. Nivel muy alto más de 100 granos/m³

con un ámbito de aplicación local y regional más adecuado.

A esta conclusión se ha llegado basándonos en que:

- a. El análisis estadístico aplicado para el cálculo de niveles umbrales mediante los percentiles 90, 95 y 99 arrojan valores altos, muy alejados de la realidad aerobiológica y clínica existente.
- b. El 70% de los días del periodo principal de polinización de *Olea* en el periodo estudiado se encuentran valores por debajo de los 50 granos/m³.
- c. El valor umbral de *Olea* de 200 granos/m³, considerado alto por el manual de calidad de la REA, se produce en menos del 2% de los días del periodo principal de polinización.

- d. El alargamiento de la estación polínica de *Olea* conduce a una disminución en el número de días que se alcanzan valores superiores a los 50 granos/m³.
 - e. La coexistencia de otros taxones de importancia alergénica que comparten el periodo principal de polinización de *Olea*, produce un efecto sinérgico y posibilita la existencia de reacciones cruzadas.
 - f. Los cálculos matemáticos usados para definir niveles umbrales arrojan índices polínicos atmosféricos absolutos, que no contemplan otros aspectos como la climatología local, que afecta al transporte y dispersión del grano de polen, o la sensibilización local de la población a cada taxón, con su predominio local y estacional, su capacidad alergénica individual, localización rural o urbana, contaminación atmosférica presente y tasa de prevalencia de enfermedades respiratorias en dicha área geográfica. Por lo que consideramos que los cálculos matemáticos deben complementarse con datos de estos aspectos para mejorar la utilidad de la información suministrada por las redes de vigilancia aerobiológica.
6. Se ha puesto en marcha la metodología de muestreo y cuantificación de aeroalérgenos de *Olea*. La baja producción de Ole e 2 no ha permitido su cuantificación en el bioaerosol en las condiciones operatorias de este estudio, habiendo encontrado valores por debajo del límite de detección de la técnica la mayor parte de los días estudiados. Por el contrario Ole e 1 se cuantifica en todas las muestras dentro de la floración de *Olea*. Por lo que proponemos que los alérgenos seleccionados en estos estudios deben ser mayoritarios.
7. De los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar que durante el periodo en el que se encuentra *Olea* presente en el aire, se obtienen cuantificaciones de su alérgeno Ole e 1 que suministran una información similar a la aportada por los recuentos tradicionales, por ello consideramos que la cuantificación en el aerosol atmosférico de la carga alergénica transportada puede ser una buena aproximación desde la Aerobiología al conocimiento de su reactividad y respuesta, constituyendo datos de interés en

los estudios epidemiológicos. Se debería extender la cuantificación del alérgeno a los periodos fuera de la floración de *Olea*.

8. Una de las limitaciones en la aplicación de la metodología de cuantificación de alérgenos es la limitación en la estandarización de los extractos utilizados como patrones, por lo que no se ha procedido a la interpretación de los cambios en los valores entre años diferentes, y para realizar las comparaciones dentro de un año se han normalizado los valores obtenidos para Ole e 1 y *Olea*. Hemos encontrado concentraciones normalizadas del alérgeno Ole e 1 que pueden ser iguales, menores o mayores a las concentraciones normalizadas de la concentración de *Olea*, sin que podamos precisar si ese comportamiento es debido a causas meteorológicas, como la presencia de lluvias, o a factores intrínsecos del grano de polen, o factores ambientales que pudieran estar influyendo en este comportamiento. Por ello proponemos como línea de futuro la evaluación de la capacidad de producción de Ole e 1 por parte de plantas de nuestra zona y la comparación con plantas de otros lugares.
9. Consideramos que siendo el grano de polen el transportador primario de los alérgenos, la posible presencia de material alergénico procedente de otras partes de la plantas o la eventual presencia de alérgeno libre, o fijado a otras estructuras, aconseja el desarrollo de metodologías que permitan cuantificar este contenido en el bioaerosol, constituyendo un complemento fundamental a las metodologías convencionales en Aerobiología. En nuestra opinión, el método de muestreo para la cuantificación de estos alérgenos debe automatizarse, permitiendo la recogida de las muestras por periodos de tiempo iguales, que deben ser diarias para nuestras características aerobiológicas y la metodología propuesta.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

- Aalberse, R.C. y Rob, C. 2000. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 228-238
- Acevedo, F.; Vesterberg, O. y Bayard, C. 1998. Visualization and quantification of birch-pollen allergens directly on air-sampling filters. *Allergy* 53: 594-601.
- Agarwal, M.K.; Swanson, M.C.; Reed, C.E. y Yunginger, J.W. 1984. Airborne ragweed allergens: Association with various particles sizes and short ragweed plant parts. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 74: 687-693.
- Agarwal, M.K.; Yunginger, J.W.; Swanson, M.C. y Reed, C.E. 1981. An immunological method to measure atmospheric allergens. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 68: 194-200.
- Akdis, C.A. y Blaser, K. 2000. Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 4: 261-269
- Alba, F.; Díaz, C.; Sabariego, S. y Nieto-Lugilde, D. 2002. Aerobiología en Andalucía: Estación de Granada. *rea* 7: 65-70
- Alcázar, P.; Cariñanos, P. y Galán, C.; Domínguez, E. 2002. Aerobiología en Andalucía: estación de Córdoba. *rea* 7: 49-54
- Alcón, F.J.; De Miguel, M.D. y Fernández-Zamudio, M.A. 2006. Modelización de la difusión de la tecnología de riego localizado en el campo de Cartagena. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros.* 210: 227-245.
- Andersen, T.B. 1991. A model to predict the beginning of the pollen season. *Grana.* 30: 269-275.
- Antépara, I; Fernández, J.C.; Jáuregui, I; Egusquiaguirre, C.; Fernández, L. y Gamboa, P.M. 1998. Estudio de la polinización en el área de Bilbao en 1995. Actualización de los estudios de sensibilización a pólenes en la población. *Rev. Esp. Allergol Clin Inmunol.* 13 nº2: 71-76
- Aránguez, E.; Ordóñez, J.M.; Serrano, J.; Aragonés, N.; Fernández-Patier, R.; Gandarillas, A. y Galán, I. 1999. Contaminantes atmosféricos y su vigilancia. *Rev. Esp. Salud Pública.* 73. 2: 123-132.
- ARB/OEHHA. Air Resources Board (ARB) and Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). 2001. Report to the Air Quality Advisory

- Committee on the Review of the California Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter and Sulfates: Chapter 7: Critical review of the health effects of particulate matter. 107-227.
- Ardusso, R.F. 2002. Prueba del parche. *Revista Enfoques Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica*. 3, 1: 7-9
- Arilla, M.C. ; González-Rioja, R. ; Ibarrola, I. ; Mir, A.; Monteseirin, J.; Conde, J.; Martinez, A. y Asturias, J. A. 2006. A sensitive monoclonal antibody-based ELISA to quantify *Parietaria judaica* major allergens, Par j 1 and Par j 2. *Clin Exp Allergy* 36(1): 87-93.
- Arilla, M.C.; Eraso, E.; Ibarrola, I.; Algorta, J.; Martínez, A y Asturias J.A. 2002. Monoclonal antibody-based method for measuring olive pollen major allergen Ole e 1. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89: 83-89.
- Arroyo L. y Puerta L.; 2003. Importancia de los Epítopes de Carbohidratos en los Alérgenos. Universidad Industrial de Santander. *Salud UIS*. 35: 71-79
- Ayuntamiento de Cartagena. 2009. El campo de Cartagena. El medio natural. Concejalía de desarrollo sostenible. Visto última vez 05/01/2010 en <http://www.gemuc.es/cma/Medio02.asp>
- Azar, S. 2006. Importancia de la creación de las redes aerobiológicas. Trabajo presentado en el VI Congreso Argentino Multidisciplinario en Asma, Alergia e Inmunología. Buenos Aires.
- BAF (British Aerobiology Federation), 2008. Visto última vez 29/02/2008 en <http://www.pollenuk.co.uk/baf/BAF.html>
- Ballester, F. 2005. Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *Rev. Esp. Salud Pública*. 79, 2: 159-175.
- Ballester-Olmos, J.F. 1991. Las plantas y la contaminación atmosférica. *Horticultura*. 70: 35-49
- Barnes, C.S.; Pacheco, F.; Landuyt, J.; Rosenthal, D.; Hu, F. y Portnoy, J.M. 1996. Production of a recombinant protein from *Alternaria* containing the reported N-terminal of the Alt a 1 allergen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 409: 197–203.
- Barral, P.; Batanero, E.; Palomares, O.; Quiralte, J.; Villalbam M. y Rodríguez, R. 2004. A Major Allergen from Pollen Defines a Novel Family of Plant

- Proteins and Shows Intra and Interspecie Cross-Reactivity. *The Journal of Immunology*. 172: 3644-3651
- Barral, P.; Suárez, C.; Batanero, E.; Alfonso, C.; Alché, J. de D.; Rodríguez-García, M.I.; Villalba, M.; Rivas, G. y Rodríguez, R. 2005. An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem J*. 390: 77-84
- Barranco, D.; Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. 2001. El Cultivo del Olivo. Editorial Mundi Prensa y Junta de Andalucía. Madrid.
- Batanero, E.; Crespo, J.F.; Monsalve, R.I.; Martín-Esteban, M.; Villalba, M. y Rodríguez, R. 1999. IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *J Allergy Clin Immunol*. 103: 147-153.
- Batanero, E.; Ledesma, A.; Villalba, M. y Rodríguez, R. 1997. Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Letters*. 410: 293-296
- Batanero, E.; Villalba, M.; Ledesma, A.; Puente, X.S. y Rodríguez R. 1996. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur. J. Biochem*. 241: 772-778
- Batanero, E.; Villalba, M.; López-Otín, C. y Rodríguez, R. 1994. Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. *Eur J Biochem*. 24: 558-564.
- Batanero, E.; Villalba, M.; Monsalve, R.I. y Rodríguez, R. 1996. Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 97, 6:1264-71.
- Beer, R.; Tinner, W.; Carraro, G. y Grisa, E. 2007. Pollen representation in surface samples of the Juniperus, Picea and Juglans forest belts of Kyrgyzstan, central Asia. *The Holocene*. 17, 5. 599–611
- Beggs P.J. 1998 Pollen and pollen antigen as triggers of asthma. What to measure? *Atmospheric Environment*. 32, 10: 1777-1783

- Beggs, P.J. 1998. Pollen and pollen antigen as triggers of asthma-What to measure? *Atmos Environ* 32:1777-1783.
- Beggs, P.J. y Bambrick H.J.; 2005. Is the Global Rise of Asthma an Early Impact of Anthropogenic Climate Change? *Environmental Health Perspectives*. 113: 915-919.
- Belmonte, J. 1988. Concentración polínica en la atmósfera de Barcelona. *Orsis*. 3: 67-75
- Belmonte, J. y Roure, J.M. 2002. Polinosis - Polen y Alergia. Mra Ediciones, S.L. Laboratorios Menarini, España. Visto última vez el 05/01/2010 en http://www.e-rinitis.com/polinosis/pdf-zip/0_introduccion.pdf.
- Blackley, C.H. 1873. Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus Aestivus (Hay fever or Hay asthma), 1-202. (Reprinted by Dawson's. London, 1959)
- Blanchan, N. 1917. Wild Flowers Worth Knowing. pág.125. Ed. Neltje Blanchan
- Boluda, L.; Alonso, C. y Fernández-Caldas, E. 1998. Purification, characterization and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J Allergy Clin Immunol*. 101: 210-216
- Bostock, J. 1828. Of the Catarrhus Aestivus or Summer Catarrh. *Med. Chir Trans London*. 14: 437
- Bourdillon, R.B.; Lidwell, O.M., y Thomas, J.C. 1941. Asht sampler for collecting and counting airborne bacteria. *Journal of Hygiene Cambridge*, 41, 197-224.
- Bourdillon, R.B. y Colebrook, L. 1946. Air hygiene in dressing-rooms for burns or mayor wounds. *Lancet*, I, 561-165.
- Bourdillon, R.B.; Lidwell, O.M., y Lovelock, J.E. 1948. Studies in air hygiene. *Medical Research Council Special Reptorts Series*, N° 262. HMSO, London.
- Bousquet, J.; Cour, P.; Guerin, B. y Michel, F.B. 1985a. Allergy in the Mediterranean area. I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier. *Clin. Allergy*. 14: 249-258
- Bousquet, J.; Guérin, B.; Hewitt, B.; Lim, S. y Michel, F.B. 1985b. Allergy in the Mediterranean area III. Cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clinical Allergy*. 15: 439-448

- Bousquet, J.; Lockey, R.; y Malling, H.J. 1998 Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J.Allergy Clin. Immunol.* 102: 558-562.
- Bousquet, P.J.; Hooper, R.; Kogevinas, M.; Jarvis, D. y Burney, P. 2007. Number of allergens to be tested to assess allergenic sensitisation in epidemiologic studies: results of the European Community Respiratory Health Survey. *Clin Exp Allergy.* 37: 780-787
- Brasó, J.V. y Jorro, G. 2003. Manual de Alergia Clínica. Masson. Barcelona. 646 pp.
- Brinner, T.J.; KUO M.C.; Keating D.M.; Rogers B.L. y Greenstein J.L. 1993. Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7608-7612.
- Bufe, A.; Spangfort, M.D.; Kahlert, H.; Schlaak, M. y Becker, W.M. 1996. The major birch pollen allergen Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta.* 199: 413-415.
- Busse, W.W.; Redd, C.E. y Hoehme, J.H. 1972. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? *J. Allergy and Clin. Immunol.* 50: 289-293.
- Busse, W.W.; Reed, C.E. y Hoehne, J.H. 1972. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? Demonstration of ragweed antigen in airborne particles smaller than intact pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 50: 289-295
- Buttner, M. P.; Willeke, K.; Ulevicius, V. y Grinshpun, S.A. 1997. Sampling and analysis of airborne microorganisms. En: Hurst, C. J. *et al*, (Ed). Manual of environmental microbiology. Ed. American Society for Microbiology, Washington.
- Buy, H. G. Du; Hollaender, A. y Lackey, M. D. 1945. A comparative study of sampling device for airborne microorganisms. *Public Health Report Washington*, 184, 40.
- Cabello, F. 1986. Medio Ambiente y Enfermedades Transmisibles. *Ambiente y Desarrollo.* Vol II, N° 3. 77-95.

- Calderon, C.; Ward, E.; Freeman, J. y McCartney, A. 2002. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Aerosol Sci.* 33: 283-296.
- Candau, P.; Carrasco, M.; Pérez, A.M.; González, F.J. y Morales, J. 2002. Aerobiología en Andalucía: Estación de Cádiz. *rea* 7: 43-48
- Caraballo, L. 1999. Analisis inmunologico y estructural de los alérgenos. *Rev. Asoc. Colomb. Alerg. Inmunol.* 8(3):9-11, Visto última vez el 05/10/2010 en: <http://encolombia.com/alergia8399analisis6.htm>
- Cariñanos, P.; Galán, C.; Alcázar, P. y Domínguez, E. 1998. Aerobiología en Andalucía: estación de Chirivel. (1995-1996). *rea* 3: 9-12
- Carnés, J. y Fernández-Caldas, E. 2002. Ole e 4 and Ole e 5, important allergens of *Olea europaea*. *Allergy*. 57, Suppl. 71: 24-28
- (DRAE) Diccionario de la Lengua Española. 2001. Real Academia Española. 22ª Edición. Editorial Espasa
- Carvajal-Urueña, I.; García-Marcos, L.; Busquets-Monge, R.; Morales Suárez-Varela, M.; García de Andoin, N.; Batlles-Garrido, J.; Blanco-Quirós, A.; López-Silvarrey, A.; García-Hernández, G.; Guillén-Grima, F.; González-Díaz, C. y Bellido-Blasco, J. 2005. Variaciones geográficas en la prevalencia de síntomas de asma en los niños y adolescentes españoles. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) fase III España. *Arch Bronconeumol.* 41(12): 659-666.
- Casas C.; Márquez, J.; Suárez-Cervera, M. y Seoane-Camba, J.A. 1996. Immunocytochemical localization of allergenic proteins in *Parietaria judaica* L. (Urticaceae). *Eur J Cell Biol.* 70: 179-188.
- Casas, C.; Márquez, J.; Suárez-Cervera, M. y Seoane-Camba, J.A. 1996. Immunocytochemical localization of allergenic proteins in *Parietaria judaica* L. (Urticaceae). *Eur. J. Cell Biol.* 70: 179-88.
- Castells, T.; Arcalis, E.; Moreno-Grau, S.; Bayo, J.; Elvira-Rendueles, B.; Belchi, J.; Seoane-Camba, J.A. y Suárez-Cervera, M. 2002. Immunocytochemical localization of allergenic proteins from mature to activated *Zygophyllum fabago* L. (Zygophyllaceae) pollen grains. *Eur. J. Cell Biol.* 81: 107-15.

- Castillo, J. 1995. Factores de riesgo de asma bronquial y atopia. *Neumosur: Revista de la Asociación de Neumólogos del Sur*. 7, 2: 5-8
- CBER FDA, 1993. (Center for Biologic evaluation and Research. Food and Drug Administration) Methods of allergenic products testing laboratory. Bethesda, MD Docket No. 94N-0012.
- Chakraborty, P.; Gupta, S.; Gupta-Bhattacharya, S. y Chanda, S. 1999. Airborne pollen of *Borassus flabellifer*: Quantification of allergen and antigen. *Aerobiologia*. 15: 49-55
- Chamorro, M. 2003. Asma por polen de *Platanus*. *Salud Rural*. Vol XX (7): 49-52
- Clot, B. 1998. Forecast of the Poaceae pollination in Zurich and Basel (Switzerland). *Aerobiologia* 14, 267–268.
- Clot, B. 2001. Airborne birch pollen in Neuchatel (Switzerland): onset, peak and daily patterns. *Aerobiologia*. 17, 25–29.
- Clot, B. 2007. Pollen dans L'air du Plateau suisse. Paramètres climatiques et nouveaux risques pour les allergies. Tesis doctoral. Faculte des Sciences, Université de Neuchâtel 6 julio
- Comtois, P. 1997. Pierre Miquel: The first professional aerobiologist. *Aerobiología*. 134: 75-82
- Comtois, P. 1998. Statistical analysis of aerobiological data. En: Mandrioli P., Comtois, P. y Levizzani V. (eds), *Methods in Aerobiology*. Pitagora Editrice: Bologna.
- Conde, J.; Benjumeda, A.; Fernández, L.; Prieto, R.; Chaparro, A.; De la Calle, A. 2002. Oleáceas: características botánicas y distribución. Polinosis: polen y alergia. *mra ediciones* 99-119.
- Corrado, A. 1992. Pollens as allergens. *Aerobiología*. 8. 1: 9-15
- Corsico, R. 1993. El asma polínico en Europa. En: F. Th. M. Spiekma, N. Nolard, G. Frenguelli & D. Van Moerbete (eds). *Polen atmosférico en Europa*, UCB-Sector farmaceutico- Braine l'Alleud.
- Cortegano, I.; Civantos, E.; López, E.; del Pozo, V.; Cádaba, B.; Gallardo, S.; Palomino, P.; del Moral, A. y Lahoz, C. 2003. Cup a 3 un nuevo alérgeno de la familia PR-5 del polen de *Cupressus arizonica*. *Alergol Inmunol Clin*. 18: 108-111

- Cortegano, I.; Civantos, E.; Aceituno, E.; Del Moral, A.; Lopez, E.; Lombardero, M.; Del Pozo, V. y Lahoz, C. 2004 Cloning and expression of a major allergen from cupressus arizonica pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy*. 59: 485-490.
- Cour P. 1974. Nouvelles techniques de d'tection des flux et des retombées polliniques: étude de la sédimentation des pollens et des spores à la surface du sol. *Pollen et spores*. 16, 1: 103-141
- D'Amato, D. 2001. Airborne paucimicronic allergen-carrying particles and seasonal respiratory allergy. *Allergy*. 56: 1109-1111
- D'Amato, G. 1981. Immunological effects induced by biological natural aerosols (pollen and spores). *Z Erkrank Atm Org*. 157: 281-286
- D'Amato, G. 2002. Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy* 57(Suppl 72): 30-33.
- D'Amato, G. y Liccardi, G. 2000. Pollen related allergy in the European mediterranean area. *Clin Exp allergy*. 24: 210-219
- D'Amato, G. y Liccardi, G. 2002. The increasing trend of seasonal respiratory allergy in urban areas. *Allergy* 57 (Suppl 71): 35.
- D'Amato, G.; De Palma, R. y Verga, A. 1991. Antigen activity of non-pollen parts (leaves and stems) of allergenic plants. *Ann. Allergy*. 67: 421-424.
- D'Amato, G.; Cecchi, L. y Liccardi, G. 2008. Thunderstorm-related asthma: Not only grass pollen and spores. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121(2): 537-538.
- D'Amato, G.; Cecchi, L.; Bonini, S.; Nunes, C.; Annesi-Maesano, I.; Behrendt, H.; Liccardi, G. y Popov, T.; van Cauwenberge, P. 2007. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*. 62: 976-990
- D'Amato, G.; Spieksma, F.T.M.; Liccardi, G.; Pager, S.; Russo, M.; Kontou-Fili, K.; Nikkels, H.; Wuthrich, B. y Bonini, S. 1998; Pollen-related allergy in Europe. *Allergy*. 53, 6: 567-78.
- Dahl, A. y Strandhede, S.O. 1996. Predicting the intensity of the birch pollen season, *Aerobiologia* 12, 97-106.
- Davies, R.R. y Smith, L.P. 1973. Forecasting the start and severity of the hay fever season, *Clin. Allergy* 3, 263-267.

- Davis, G.L. 1967. The anther tapetum, Ubish granules and hay fever. *Austr J Sci.* 30: 235-236
- De Cesare, F.; Pini, C.; Di Felice, G.; Caiaffa, M.F.; Macchia, L.; Tursi, A.; Tinghino, R.; Palumbo, S.; Sallusto, F. y Federico, R. 1993. Purification an fine charecterization of major allergen from *Olea europaea* pollen extract. *Allergy.* 42: 248-254.
- De la Rosa, M.C.; Mosso, M.A. y Ullán, C. 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental.* 5: 375-402
- De la Torre, F. 1998. La Primavera y la Alergia. *Revista del colegio Oficial de Médicos de la provincia de Santa Cruz de Tenerife* Julio/Agosto: 8-9. Visto última vez el 05/01/2010 en: <http://www.comtf.es/ActaMedica/1998/7-8/Pag8y9.htm>
- De Linares, C.; Nieto-Lugilde, A.; de la Guardia, C.; Galan, C. y Trigo, M.M. 2007. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain. *Clinical and experimental allergy* 37(1):125-132.
- De Linares, C.; Nieto-Lugilde, D.; Alba, F.; Díaz de la Guardia, C.; Galán, C. y Trigo, M.M. 2007. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S. Spain. *Clinical and Experimental Allergy* 37: 125-132.
- Deviller, P. 1995. Les profilines. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 35(3):307-308.
- Diaz-Sánchez, D.; Tsien, A.; Fleming, J. y Saxon, A. 1997. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *The Journal of Immunology.* 158, 5: 2406-2413
- Dodd Memorial Library. 2008. Visto última vez el 05/01/2010 en: <http://dodd.cmcvelling.ac.in/hom/09%20-%20Rhazes.html>
- Duce, F. 1999. Tests epicutáneos para el diagnóstico de la alergia. En "Ensayo clínico en asma" Cap. 8: 101-115 Visto última vez el 15/02/2008 en Biblioteca en edición digital <http://www.azprensa.com>.

- Driessen M.N.B.M., Van Herpen R.M.A. y Smithuis L.O.M.J. 1990. Prediction of the start of the grass pollen season for the southern part of the Netherlands, *Grana* 29, 79–86.
- Durham, O.C. 1946. The volumetric incidence of atmospheric allergens IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting and volumetric interpollation of results. *J. Allergy*. 17, 2: 79-86
- Edmonds R: 1979. Aerobiology. The ecological systems approach. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg. Pensylvania. EEUU
- Edmonds, R. y Bennihoff, W.S. 1973. Aerobiology and its modern applications. US/IPB Aerobiology Report nº 3. Botany Department, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1-18
- El-Ghazaly, G.; Takahashi, Y.; Nilsson, S.; Grafström, E. y Berggren, B. 1995. Orbicules in *Betula pendula* and their possible role in allergy. *Grana* 34: 300-304.
- Elvira-Rendueles, B. 2001. Caracterización aeropalinológica del bioaerosol atmosférico de Cartagena. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena.
- Elvira-Rendueles, B. 2001. Caracterización aeropalinológica del bioaerosol atmosférico de la ciudad de Cartagena. Tesis Doctoral.
- Elvira-Rendueles, B. 2009. Aerobiología de Cartagena 2008. En: Aerosol Atmosférico de Cartagena: Red de Captación de Alto Volumen, Materia Particulada Sedimentable, Aerobiología. Informe Anual al Excmo. Ayuntamiento de Cartagena 2008. Moreno Clavel y Moreno Grau Eds. Cartagena: 60-63.
- Emberlin, J. 1995. Analysis of allergens on airborne particles. Progress and problems. 3. Europäisches Pollenflug-Symposium.
- Emberlin, J. 1995. Analysis of allergens on airborne particles: Progress and problems. In: 3 Europäisches Pollenflug
- Emberlin, J; Detandt, M.; Gehrig, R.; Siegfried, J.; Nolard, N. y Rantio-Lehtimäki, A. 2002. Responses to the Start of *Betula* (birch) Pollen Seasons to Recent Changes in Spring Temperatures Across Europe. *International Journal of Biometeorology*. 46, 4: 159-170.

- Erdtman, G. 1969. Handbook of Palynology - An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores. Munksgaard, Copenhagen.
- Eseverri, J.L.; Marín, A.; Ranea, S.; Ferré, L.; Muñoz, R. y Para, A.; 2004. La Marcha alérgica. *An Pediatr* ; 60(Supl 1): 44-45
- Espejo, C. 1989. El olivar, un cultivo en retroceso en la región de Murcia. *papeles de geografía*. 15: 33-42
- Faegri, K. e Iversen, J. 1989. Textbook of pollen analysis. J. Wiley and Sons, New York.
- Fahlbusch, B.; Müller, W.D.; Rudeschko, O.; Jäger, L.; Cromwell. O. y Fiebig, H. 1998. Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy*. 28, 7: 799-807
- Feo, F. 2003. Aerobiología y polinosis por Oleáceas. *Alergol Immunol Clin*. 18 (Extraordinario Núm. 3): 19-23
- Feo, F. 2003. Aerobiología y polinosis por oleáceas. *Alergol Immunol Clin*. 18 extraordinario nº3: 19-23
- Feo, F.; Cárdena, B.; Lahoz, C.; Subiza, J.; Jerez, M. y López, G. 2000. Oleaceae. Descripción y distribución en España. "Atlas de Aerobiología y Polinosis" Forum Siglo XXI. Schering Plough.
- Fernandez-Caldas, E.; Swanson, M.C.; Pavda, J.; Welsh, P.; Yunginger, W. y Redd, C.E. 1989. Immunochemical demonstration of Red Oak pollen aeroallergens outside the pollen season. *Grana* 28: 205-209.
- Ferreira, F.; Hirtenlehner, K.; Jilek, A.; Godnik-Cvar, J.; Breiteneder, H.; Grimm, R.; Hoffmann-Sommengruber, K.; Scheiner, O.; Kraft, D.; Breitenbach, M.; Rheinberger, H. y Ebner, C. 1996. Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J. Exp. Med*. 183: 599-609
- Firbas, F. 1931. Über die Bestimmung der Walddichte und der vegetation Waldloser Gebiete mit Hilfe der Pollenanalyse. *Planta*: 22: 109-145
- Florido, F.; Quiralte, J. y Martín, E. 2003. Aspectos clínicos de la alergia al polen de olivo. *Alergol Immunol Clin*. 18: 93-99

- Fortuny, J. 2002. Metodología del análisis sectorial en el sistema agroalimentario, aplicada al sector oleícola catalán. Evaluación de la competitividad, el progreso tecnológico y la eficiencia económica empresarial. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña
- Frenguelli, G.; Tedeschini, E.; Veronesi, F. y Bricchi, E. 2002. Airborne pine (Pinus spp.) pollen in the atmosphere of Perugia (Central Italy): Behaviour of pollination in the two last decades, *Aerobiologia* 18, 223–228.
- Frenguelli, G. 2003. Pollen Structure and morphology. *Postepy Dermatologii i Alergologii XX*. 200-204
- Galán, C.; Cariñanos, P.; Alcázar P. y Domínguez E. 2007. Manual de Calidad y Gestión de la Red Española de Aerobiología, REA. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba
- Galán, C.; Cariñanos, P.; Alcázar, P.; Infante, F.; Castro, A. y Domínguez, E. 1998: Aerobiología en Andalucía: estación de Córdoba. REA 4:21-24
- García, H.M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag.* 1, 2: 31-41
- García, J.J. 1999. Polinosis, una enfermedad en aumento. REA 5: 13-16
- García, P. 2003. Alergias. Capítulo 21 tratado de Inmunología e Inmunopatología. Visto última vez el 05/01/2010 en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/>
- García-Mozo, H.; Galan, C.; Gomez-Casero, M.T. y Dominguez-Vilches E. 2000. A comparative study of different temperature accumulation methods to predicting the start of the Quercus pollen season in Cordoba (South West Spain). *Grana* 39, 194–199.
- Gell P.G.H. y Coombs R.R.A. 1963 Clinical aspects of Immunology, 2ª ed Oxford: Blackwell Science. 575-96.
- Gastaminza, G.; Bartolome, B.; Bernedo, O.; Uriel, M.; Audicana, M.T.; Echenagusia, M.A.; Fernández, E. y Muñoz, D. 2005. Alergia al polen de las oleaceas en un lugar donde no hay olivos. *Alergol Inmunol Clin.* 20: 131-138

- Giorato, M.; Lorenzoni, F.; Bordin, A.; De Biasi, G.; Gemignani, C.; Schiappe M. y Marcer G. 2000. Airborne allergenic pollens in Padua: 1991-1996. *Aerobiologia*. 16: 453-464
- Goetz, A. 1953. Application of molecular filter membranes to the analysis of aerosols. *American Journal of Public Health*. 43: 150-159.
- Goldschmidt-Clermont, P.J.; Machesky, L.M.; Baldassare, J.J. y Pollard, T.D. 1990. The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*. 247. 4950: 1575-1578
- González, E.; Monsalve, R.; Puente, X.S.; Villalba, M. y Rodríguez, R. 2000. Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization. *J. Pept. Res.* 55, 1: 18.
- González, E.M.; Villalba, M. y Rodríguez, R. 2000. Allergenic cross-reactivity of olive pollen. *Allergy*. 55. 7: 658-663
- González, F.J.; Iglesias, I.; Jato, V.; Aira, M.J.; Candau, P.; Morales, J. y Tomás, C.; 1998. Study of the pollen emissions of Urticaceae, Plantaginaceae and Poaceae at five sites in western Spain. *Aerobiología* 14: 117-129
- Gousmett, C. 2009. "Creation Order and Miracle According to Augustine," *The Evangelical Quarterly* 60.3 (July 1988): 217-240. Visto última vez el 05/01/2010 en: http://www.earlychurch.org.uk/pdf/eq/creation_gousmett.pdf
- Gregory, P.H. 1961. *The Microbiology of the Atmosphere*, Leonard Hill, Aylesbury.
- Gregory, P.H.; Monteith, J.L. y Scourfield, M. 1967. *Airborne Microbes: Seventeenth Symposium of the Society for General Microbiology*. Ed Cambridge University Press. Cambridge
- Gregory, P.H. 1973. *The Microbiology of the Atmosphere*. Ed. Leonard Hill. Plymouth.
- Grote, M.; Hayek, B.; Reichelt, R.; Kraft, D. y Valenta, R. 1999. Immunogold electron microscopic localization of the cross-reactive two-EF-Hand Calcium-binding birch pollen allergen Bet v 4 in dry and rehydrated birch pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120: 287-94.

- Grote, M.; Valenta, R. y Reichelt, R. 2003. Abortive pollen germination: A mechanism of allergen release in birch, alder and hazel revealed by immunogold electron microscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 1017-23.
- Guidós, G.A. y Almeida, V.M. 2005. Polinosis y aeroalérgenos. *Alergia asma e inmunología pediátrica* 14. 2: 52-55
- Guidos, G.A. y Almeida, V.M. 2005. Polinosis y aeroalérgenos. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 14:2 52-55
- Hamman-Khalifa, A.; Castro, A.J.; Jiménez-López, J.C.; Rodríguez-García, M.I. y Alché, J.D. 2008. Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen. *BMC Plant Biology* 8: 10 pp.
- Han, S.H.; Chang, Z.N.; Chang, H.H.; Chi, C.W.; Wang, J.Y. y Lin, C.Y. 1993. Identification and characterization of epitopes on Cyn d I, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 91, 5:1035-41
- Hernández, A. 2003. Ministerio de Trabajo y asuntos sociales. NTP 609. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
- Hesselman, H. 1919. Über die Verbreitungsfähigkeit des Waldbaumpollens. *Medd. Skogsförsöksanst.* 16: 27-60
- Heumann, W.L. 1997. Industrial air pollution Control Systems. *Mc Graw Hill*. 305-335
- Hirst, J.M. 1952. An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biol.* 39: 257-265
- Hofmann, W.; Asgharian, B. y Winkler-Heil, R. 2002. Modeling intersubject variability of particle deposition in human lungs. *J. Aerosol Sci.* 33: 219-235.
- Holmquist, L. y Vesterberg, O. 1999. Luminiscence immunoassay of pollen allergens on air sampling polytetrafluoroethylene filters. *J. Biochem. Biophys. Methods* 41: 49-60.
- Hoyne, G.F.; O'Hehir, R.E.; Wraith, D.C.; Thomas, W.R. y Lamb, J.R. 1993. Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T epitope in naive and sensitized mice. *J. Exp. Med.* 178: 1783-1788.
- Huecas, S. 2001. Biología molecular y caracterización inmunológica de dos alérgenos principales del polen de olivo: Ole e 1 Y Ole e 9. Memoria para el

- acceso al grado de doctor. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid
- Huecas, S.; Villalba, M. y Rodríguez, R. 2001. Ole e 9, a Major Olive Pollen Allergen is a 1,3- β -Glucanase. Isolation, Characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 30: 27959-27966
- Hulshof, O.K. y Manten, A.A. 1971. Bibliography of Actuopalynology 1671-1966. *Rev. Palaeobot. Palynol.*; 12: 1-243.
- Huynen, M. y Menne, B. 2003. Phenology and human health: allergic disorders. Report of a World Health Organization (WHO) meeting, Rome, Italy, 16-17 January 2003. Health and global environmental change, Series No. 1. (EUR/02/5036813). Rome, Italy: WHO.
- ISAAC. 1998. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. Worldwide Variation in Prevalence of Symptoms of Asthma, Allergic Rhinoconjunctivitis, and Atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 351: 1225-32.
- Jäger, S.; Nilsson, S.; Berggren, B.; Pessi, A.M.; Helander, M. y Ramford, H. 1996. Trends in home airborne tree pollen in the Nordic countries and Austria, 1980-1993: A comparison between Stockholm, Trondheim, Turku and Vienna. *Grana*. 35: 171-178
- Jato, V.; Dopazo, A. y Aira, M.J. 2002. Influence of precipitation and temperature on airborne pollen concentration in Santiago de Compostela (Spain). *Grana*. 41: 232-241
- Jato, V.; Rodríguez-Rajo, F.J.; Alcázar, P.; De Nuntiis, P.; Galán, C. y Mandrioli, P. 2006. May the definition of pollen season influence aerobiological results? *Aerobiologia*. 22: 13-25
- Kauppinen, E.I.; Jäppinen, A.V.K.; Hillamo, R.E.; Rantio-Lehtimäki, A.H. y Koivikko, A.S. 1989. A static particle size selective bioaerosol sampler for the ambient atmosphere. *J. Aerosol Sci.* 20: 829-838.
- Kethley, T.W. Gordon, M.T. y Orr, C. 1952. A thermal precipitator for aerobacteriology. *Science*. 116. 368-369.

- Klysner, S.; Welinder, K.G.; Lowenstein, H. y Matthiesen, F. 2006. Group V allergens in grass pollens: IV. Similarities in amino acid compositions and NH₂-terminal sequences of the Group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clinical & Experimental Allergy*. 22, 4: 491 - 497
- Knox, R.B. 1993. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin. Exp. Allergy* 23: 354-359.
- Knox, R.B. 1993a. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin Exp Allergy*. 23: 354-359.
- Knox, R.B. y Suphioglu, C. 1996. Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science*. 1, 5: 156-164
- Knox, R.B.; Suphioglu, C.; Taylor, P.; Desai, R.; Watson, H.C.; Peng, J.L. y Bursill, L.A. 1997. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy*. 27, 3: 246-251.
- Lacey, J.; Crook, B. y Janaki Bai, A. 1996(a). The detection of airborne allergens implicated in occupational asthma. En: *Aerobiology*. Muilemberg, M y Burge, H. ed. CRC Press. Lewis Publishers. Boca Raton. pp. 133-144.
- Lacey, J.; Williamson, P y Crook, B. 1996(b). Microbial Emission from Compost and Associated Risks-Trials and Tribulations of an Occupational Aerobiologist. En: *Aerobiology*. Muilemberg, M y Burge, H. ed. CRC Press. Lewis Publishers. Boca Raton.; 1-16.
- Lahoz, C. y Florido, F. 2007. Introduction. *J Investig Allergol Clin Immunol*. Vol 17, Supplement 1: 54-55
- Lara, P.; Guerrero, R.; Molina, J.J. y Santamaría, M. 2010. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. Sociedad Andaluza de Medicina Intensiva, Urgencias y Coronarias. Edición electrónica. Visto última vez el 05/01/2010 en: <http://tratado.uninet.edu/indice.html>
- Larson, C.; Francl, L.J. y Friesen, T. 2001. Evaluation of the Burkard Cyclonic Spore Sampler for Collection Efficiency of Ascospores. *Plant Disease*. 85, 12: 1249-1252.

- Ledesma, A.; Moral, V.; Villalba, M.; Salinas, J. y Rodríguez, R. 2006. Ca²⁺-binding allergens from olive pollen exhibit biochemical and immunological activity when expressed in stable transgenic *Arabidopsis*. *FEBS Journal*. 273: 4425-4434.
- Ledesma, A.; Rodríguez, R. y Villalba, M. 1998b. Olive-pollen profilin. Molecular and immunological properties. *Allergy*. 53: 520-526
- Ledesma, A.; Villalba, M.; Batanero, E. y Rodríguez, R. 1998a. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem*. 258: 454-459
- Ledesma, A.; Villalba, M.; Vivanco, F. y Rodríguez, R. 2000. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca²⁺ -binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Letters* 466: 192-196
- Ledesma, A.; Villalba, M.; Vivanco, F. y Rodríguez, R. 2002. Olive pollen allergen Ole e 8: identification in mature pollen and presence of Ole e 8-like proteins in different pollens. *Allergy*. 57: 40-43
- Legrand, M.; Kauffmann, S.; Geoffroy, P. y Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis- related proteins: four-tobacco pathogenesis- related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 6750 -54.
- Lewis, W.H.; Vinay, P. y Zenger, V.E. 1983. Airborne and allergenic pollen of North America. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 254 pp
- Lejoly-Gabriel, M y Leuschner, R.M. 1983, Comparison of air-borne pollen at Louvain-la Neuve (Belgium) and Basel (Switzerland) during 1979 and 1980, *Grana* 22, 59–64.
- Lombardero, M.; Barbas, J.A.; Moscoso del Prado, J. y Carreira, J.; 1994. cDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e I. *Clin Exp Allergy*. 24, 8:765-770.
- Lombardero, M.; Obispo, T.; Calabozo, B.; Lezaún, A.; Polo, F. y Barber, D. 2002. Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins. *Allergy*. 57: Suppl. 71: 29-34
- Lombardero, M.; Quirce, S. y Duffort, O. 1992. Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen

- and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantification of the allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 89: 884-94
- London, S.J. and Romieu, I. 2000. Health cost due to outdoor air pollution by traffic. *Lancet.* 356:782-783.
- Luckiesh, M.; Taylor, A.H. y Holladay, L.L. 1946. Sampling Devices for Airborne Bacteria. Lighting Research Laboratory, General Electric Company, Nela Park, Cleveland
- Lynch, J. M. y Poole, N.J. 1979. Microbial Ecology: a conceptual approach. Ed.Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Mandrioli, P. 2000. Method for Sampling and Counting of Airborne Pollen and Fungal Spores. Institute of Atmospheric and Oceanic Sciences (ISAO). National Research Council (CNR). Bologna, Italy
- Mario, G. 2001. Cien años de anafilaxia. Artículo especial. *Alergol Immunol Clin.* 16:364-368
- Martínez, A. y Martínez J.A. 2000. Relevancia alergénica de las profilinas. *Alergol Immunol Clin.* 15(Extraordinario 2): 119-124
- Martínez, A.; Asturias, J.A.; Monteseirin, J.; Moreno, V.; Garcia-Cubillana, A. ; Hernandez, M.; De La Calle, A.; Sanchez-Hernandez, C.; Perez-Formoso, J.L. y Conde, J. 2002..The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy.* 57(71): 17-23.
- Martínez, A.; Martínez, J.; Llamazares, A. y Palacios, R. 1992. Comparison of in-house reference extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Phleum pratense* with the WHO International Standards. *Allergol et Immunopathol.* 20: 106-112
- Martínez, C. 2002. 1ª Ponencia: Causas del aumento de las enfermedades alérgicas. *Alergol Immunol Clin.* 17 (Extraordinario núm. 2): 1-29
- Matthews, J.D. 1963. Factors affecting the production of seed by forest trees. *Forestry Abstr.* 24: i-xiii
- Matthiesen, F. y Lowenstein, H. 1991. Group V allergens in grass pollens. II. Investigation of group V allergens in pollens from 10 grasses. *Clin. Exp. Allergy.* 21: 309-320.

- May, K.R. 1945. The cascade impactor: an instrument for sampling coarse aerosols. *Journal of Sciences Instruments*. 22: 187-95.
- McMichael, A.J. y Githeko, A.K. 2001. Human health. En: McCarthy JJ *et al*, (eds). Climate change. IPCC, WG II, TAR, 9.7.1
- Melillo, G.; D'Amato, G, Luccardi, G.; D'Agostino, F. y Schiano, M. 1985. Allergy to *Olea europaea* pollen: relationship between skin prich test, RAST, ELISA and bronchial provocation test. *Allergol et Immunopathol*. 13, 3: 229-234
- Miki-Hirosige, H.; Nakamura, S.; Yasueda, H.; Shida, T. y Takahashi, Y. 1994. Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex Plant Reprod*. 7: 95-100.
- Miller, N.L. y Wang, P.K. 1988. Theoretical determination of the efficiency of aerosol particle collection by falling columnar ice crystals. *Journal of atmospheric sciences*. 46, 12: 1656-1663
- Miquel, P. y Cambert, R. 1901. Traité de bacteriologie pure et appliqueé. Ed. Masson et Cia, París
- Molina, C. 2003. Qualité de l'air et allergie. *Revue Francaise del Laboratoires* 349:35-42.
- Moore, P.; Webb, J.A. y Collinson, M.E. 1991. Pollen analysis. 2ª ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 216 pp.
- Morales, S.; Jiménez-López, J.C.; Castro, A.J.; Rodríguez-García, M.I. y Alché, J.D. 2008. Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during *in vitro* pollen germination. *Journal of microscopy* 231 (2): 332 -341.
- Morales, S.; Jiménez-López, J.C.; Castro, A.J.; Rodríguez-García, M.I. y Alché, J.D. 2006. Caracterización molecular y localización de profilinas en el polen de olivo. Abstracts XV A.P.L.E. Symposium. Vol 16
- Morawska, L. y Zhang, J.J. 2002. Combustion sources of particles. 1. Health relevance and source signatures. *Chemosphere* 49: 1045-1058.
- Moreno. S.; Elvira-Rendueles, B.; Angosto, J.M.; Bayo, J; Moreno, J; Vergara, N.; Belchí, J. y Moreno, J. 2002. Aerobiología en Murcia: Estación de Cartagena (2000-2001), REA (7): 243-248

- Moreno-Grau, S.; Elvira-Rendueles, B.; Moreno, J.; García-Sánchez, A.; Vergara, N.; Asturias, J.A.; Arilla, M.C.; Ibarrola, I.; Seoane-Camba, J.A. y Suárez-Cervera, M. 2006 Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 96(6): 858-864.
- Moulton, S. 1942. *Aerobiology. Amer. Assoc. Adv. Sci.* Washington. 17: 1-289.
- Mygind N.; Pedersen S.; Dahl R. y Thestrup-Pedersen K. 1996. Allergens en Essential Allergy p 81. Williston, Vermont, U.S.A. Blackwell Publishing.
- NATIBO (North American Technology and Industrial Base Organization) 2001. Biological detection systems technology and industrial base report.
- Navarro, A. 2006. Material didáctico Inmunología. Tema 11. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla
- Negrini, A.C. 1992. Pollens as allergens. *Aerobiologia* 8: 9- 15.
- Negro, J.M. 2004. Alergia al polen. Alergomurcia, temas divulgativos. www.alergomurcia.com/
- Negro, J.M. y Miralles, J.C. 2004. Aumento de la alergia al polen. Temas divulgativos de Alergomurcia. Visto última vez el 05/01/2010 en: http://alergomurcia.com/pdf/Aumento_alergia_al_polen.pdf.
- Nester, E.W. 1983. Microbiology. Third Edition. Saunders CBS College Publishing. New York
- Newnham, R.M. 1999. Monitoring biogeographical response to climate change: The potential role of aeropalynology. *Aerobiologia* 15, 87–94.
- Niederberger, V.; Niggemann, B.; Kraft, D.; Spitzauer, S. y Valenta, R. 2001. Evolution of IgM, IgE and IgG1-4 antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *European Journal of Immunology*. 32-2: 576-584
- Niederberger, V.; Pauli, G.; Grönlund, H.; Fröschl, R.; Rumpold, H.; Kraft, D.; Valenta, R. y Spitzauer, S. 1998. Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J Allergy Clin Immunol*. 102(4 Pt 1): 579-591.

- Nilsson, S. y Persson, S. 1981 Three pollen spectra in the Stockholm region (Sweden), 1973-1980. *Grana*. 20: 179-182.
- Norris, J. 1998. A method to forecast the start of the *Betula*, *Platanus* and *Quercus* pollen seasons in North London, *Aerobiologia* 14, 165–170.
- Ong, B.K.; Singh, M.B. y Knox, R.B. 1995. Aeroallergens of plant origin: molecular basis and aerobiological significance. *Aerobiologia* 11: 219-229
- Osterballe, O. y Weeke, B. 1979. A new lancet for skin prick testing. *Allergy*. 34, 4: 209-212.
- Pacini, E. y Franchi, G.G. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Syst Evol Suppl.* 7: 1-11.
- Pacini, E.; Franchi, G.G.; Lisci, M. y Nepi, M. 1997. Pollen Viability Related to Type of Pollination in Six Angiosperm Species. *Annals of Botany*. 80: 83–87
- Pagán, J.A.; Félix, R.; Martínez, J.; García, F.J.; Ferrer, A.; Martos, M.D.; Munuera, M.; Contreras, L. y Carreño, A. 2004. Alérgenos. En Rinitis Alérgica. Mecanismos y Tratamiento. Capítulo 14. Visto última vez en: http://alergomurcia.com/pdf/librorinitis/Rinitis_Cap_14.pdf
- Pathirane, L. 1975. Aerobiological literature in scientific periodicals. *Grana*. 15: 145-147.
- Pedraza, M.M.; Rodríguez, A. 2004. Bases inmunológicas y moleculares de la alergenidad. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 13: 5-10
- Pehkonen, E. y Rantio-Lehtimäki, A. 1995. Sensitivity of IgG-ELISA for detecting airborne pollen antigens of Betulaceae. *Grana* 34: 350-356.
- Pehkonen, E. y Rantio-Lehtimäki, A. 1994. Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic factors. *Allergy* 49: 472-477.
- Pehkonen, E. y Rantio-Lehtimäki, A. 1994. Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic factors. *Allergy*. 49, 6: 472-477.
- Peláez, A. y Félix, R. 2004. Técnicas in vitro. En Libro Rinitis, Cap 16: 231-236. Visto por última vez el 05/01/2010 en <http://www.alergomurcia.com>
- Pelta, R. 2004. Rinitis Alérgica (Mecanismos y tratamiento). Capítulo 1. Mra ediciones Barcelona

- Peña, J. y Cabello, A. 2003. Inmunología. Capítulo 1 tratado de Inmunología e Inmunopatología. Visto última vez el 05/01/2010 en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/>
- Perkins, W.A. 1957. The Rotorod sampler. Second Semiannual CML. 186, Aerosol Laboratory, Standford University, California. En *Bioaerosol Handbook*
- Pilyavskaya, A.; Wieczorek, M.; Jones, S.W. y Gross, K. 1995. Isolation and characterization of a new basic antigen from short ragweed pollen (*Ambrosia artemisiifolia*). *Mol. Immunol.* 32: 523-529
- Pinto, J.A. y Martínez, J.R. 2005. El Aceite de Oliva y la Dieta Mediterránea. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Sanidad y Consumo. Comunidad de Madrid. *Nutrición y salud.* 7: 8-9
- Podczek, F. 1999. The influence of particles size distribution and surface roughness of carrier particles on the in vitro properties of dry powder inhalations. *Aerosol Sci Tech* 31: 301-321.
- Pomes, A. 2002. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy.* 57: 673-679
- Porter, R.R. 1972. Structural studies of immunoglobulins. Nobel Lecture 1972. Department of Biochemistry. Oxford University, England.
- Portnoy, J.; Pacheco, F; Ballam, Y. y Barnes, C. 1993. The effect of time and extraction buffers on residual protein and allergen content of extracts derived from four strains of *Alternaria*. *J. Allergy Clin.Immunol.* 91: 930-938.
- Porsbjerg, C.; Rasmussen, A. y Backer V. 2003. Airborne pollen in Nuuk, Greenland, and the importance of meteorological parameters, *Aerobiologia* 19, 29-37.
- Poulsen, L.K. 2001. In vivo and in vitro techniques to determine the biological activity of food allergens. *Journal of Cromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756: 41-55
- Priori, P. 1996. A History of Medicine. Publicado por Horatius press, página 249.

- Puc, M. 2003. Characterization of Pollen Allergens. *Ann Agric Environ Med.* 10: 143-149
- Puiggrós, A.; González, V. y Bartra, J. 2008. Alergia a plantas y árboles ornamentales. *Polinosis III: Polen y alergia*. pp 81-91 mra ediciones, S. L.
- Quiralte, J.; Llanes, E.; Barral, P.; Arias de Saavedra, J.M.; Sáenz de San Pedro, B.; Villalba, M.; Florido, J.F.; Rodríguez, R.; Lahoz, C. y Cárdbaba, B. 2005. Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy.* 60, 3: 360-365
- Quiralte, J.; Palacios, L.; Rodríguez, R.; Cárdbaba, B.; Arias de Saavedra, J.M.; Villalba, M.; Florido, J.F. y Lahoz, C. 2007. Modelling Diseases: The Allergens of *Olea europaea* Pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17(Supplement 1): 76-82.
- Quiralte, J.; Palacios, L.; Rodríguez, R.; Cárdbaba, B.; Arias de Saavedra, J.M.; Villalba, M.; Florido, J.F. y Lahoz, C. 2007. Modelling Diseases: The Allergens of *Olea europaea* Pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 17, Supplement 1: 76-82
- Quirce, S. 1998. Asma ocupacional por soja. Sesiones Interhospitalarias. *Sociedad Castilla la Mancha de Alergología e Inmunología Clínica*: 137-149
- Rantio-Lehtimäki, A.; Viander, M. y Koivikko, A. 1994. Airborne birch pollen antigens in different particles sizes. *Clin. Exp. Allergy* 24: 23-28.
- Rantio-Lehtimäki, A.; Viander, M. y Koivikko, A. 1994. Airborne birch pollen antigens in different particle sizes. *Clinical and Experimental Allergy.* 24: 23-28
- Recio, M. 1999. Aerobiología: Breve introducción histórica. *REA* 5: 9-11
- Recio, M.; Trigo, M.M.; Docampo, S. y Cabezudo, B. 2002. Aerobiología en Andalucía: Estación de Málaga. *rea* 7: 83-88
- Reille, M. 1992. Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie. Marseille.
- Reille, M. 1992. Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du nord. Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie. URA CNRS:Marsella. 520 pp.

- Reina, M. 2003. Material docente elaborado para la Universitat de Barcelona. Visto por última vez el 05/01/2010 en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm>
- Renault-Miskovsky, J. y M. Petzold. 1992. Pollens et spores. Delachaux & Niestlé, Neuchâtel, Suisse, 360 p.
- Renström, A.; Gordon, S.; Larsson, P.H.; Tee, R.D.; Newman, A.J. y Malmberg, P. 1997. Comparison of a radioallergosorbent (RAST) inhibition method and a monoclonal enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for aeroallergen measurement. *Clinical and Experimental Allergy*, 27: 1314-1321.
- Riediker, M. ; Koller, T. y Monn, C. 2000. Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clin. Exp. Allergy* 30: 867-873
- Riediker, M.; Koller, T. y Monn, C. 2000. Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clinical and Experimental Allergy*. 30: 867-873
- Rodríguez, R. y Villalba, M. 1997. Reacciones cruzadas entre alérgenos: implicación de los carbohidratos. *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín*, Octubre. 12, 5: 269-281
- Rodriguez, R. y Villalba, M. 2005. Avances en los estudios de la alergia al polen de olivo. Publicación en la revista "Tribuna Complutense" de la Universidad Complutense de Madrid. 25: 17
- Rodríguez, R.; Villalba, M.; Batanero, E.; González, E.M.; Monsalve, R.I.; Huecas, S.; Tejera, M.L. y Ledesma, A. 2002. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy*. 57: 6-16
- Rodríguez, R.; Villalba, M.; Batanero, E.; Palomares, O.; Quiralte, J.; Salamanca, G.; Sirvent, S.; Castro, L. y Prado, N. 2007. Olive Pollen Recombinant Allergens: Value in Diagnosis and Immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 17, Supplement 1: 56-62
- Rodriguez-Rajo, F.J.; Seijo, M.C. y Jato, V. 2002. Estudio aerobiológico de la atmósfera de A Guardia, NO de España (1998). *rea* 7: 7-15
- Rogers, C. 1997. An aeropalynological study of metropolitan Toronto, *Aerobiologia* 13, 243–257.

- Romagnani, S. 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105, 3: 399-408
- Román, R. 2002. Lucrecio: razón filosófica contra superstición religiosa. UNED Centro Asociado Córdoba, HUM 364, Historia de la Filosofía
- Romero, S.J. 2002. Prevención de alergia y asma. Salud en Tabasco. Secretaría de salud del estado de Tabasco. 8, 2: 83-86
- Rossi, R. y Monasterolo, G. Molecule Allergeniche in Allergologia Clinica. Immunoway
- Rouvinen, J.; Rautiainen, J.; Virtanen, T.; Zeiler, T.; Kauppinen, J.; Taivainen, A. y Mäntytjärvi, R. 1999. Probing the Molecular Basis of Allergy. Three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *The journal of biochemical chemistry*. 274, 4: 2337-2343
- Sabariego, S.; Díaz, C.; Alba, F. y Mota, J.F. 2002. Aerobiología en Andalucía: Estación de Almería. *rea* 7: 33-38
- Sakaguchi, M.; Intuye, S.; Takahashi, Y.; Katagiri, S. y Yasueda, H. 1995. Immunoblotting of mite aeroallergens collected with an indoor Burkard air sampler. *Aerobiol* 11: 265-268.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2004. Curso de introducción a la inmunología porcina, capítulo 4 “Inmunoglobulinas porcinas”. Visto última vez el 05/01/2010 en: <http://www.sanidadanimal.org/cursos/inmuno2/ca041.htm>
- Sarrazola, M.D. y Cabeza, L. 2003. Los orígenes del asma: ¿La hipótesis de la higiene puede aplicarse en América Latina?. *Clon*. 1, 2: 37-40
- Schäppi, G.F.; Monn, Ch.; Wüthrich, B. and Wanner, H.U. 1996. Analysis of allergens in ambient aerosols: Comparison of areas subjected to different levels of air pollution. *Aerobiologia* 12: 185-190.
- Schäppi, G.F.; Suphioglu, C.; Taylor, P.E. y Knox, R.B. 1997. Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *J Allergy Clin Immunol*. 100, 5: 656-661.
- Schäppi, G.F.; Taylor, P.E.; Staff, I.A.; Rolland, J.M. y Suphioglu, C. 1999. Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy* 55: 478-483.

- Schumacher, M.J.; Griffith, R.D. y O'Rourke, M.K. 1988. Recognition of pollen and other particulate aeroantigens by immunoblot microscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 608-616.
- SEAIC. 1992 Informe Alergológica año 1992.
- SEAIC. 2005. Informe Alergológica año 2005.
- Sierra, P.A. 2000. Los factores inmunológicos y otros factores de la leche materna. *Revista Colombiana de Pediatría.* 35, 3
- Smith, A.M. y Chapman, M.D. 1996. Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: Contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. *Molecular Immunology.* 33, 4-5: 399-405
- Soler-Escoda, J.M. y Eiró, R. 2005. Inmunoterapia en patología alérgica pediátrica. *Pediatr Integral.* IX, 8: 575-590.
- Solomon, A.M. y Hayes, H.D. 1972. Desert pollen production: 1. Qualitative influence of moisture. *J. Ariz. Acad. Sci.* 7, 2: 52-74.
- Solomon, W.R. y Jelks, M.I. 1997. Airborne Allergens. En "Allergy". A.P. Kaplan (ed.) W.B. Saunders Company. 2ª edic. 344-385
- Solomon, W.R.; Burge, H.A. y Muilenberg, M.L. 1983. Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72: 443-447.
- Solomon, W.R.; Burge, H.A. y Muilenberg, M.L. 1983. Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J. Allergy Clin Immunol.* 72: 443-447
- Spieksma, F.; Norland, N. y Frenguelli, G. 1993. Polen atmosférico en Europa en "Polen atmosférico en Europa". UCB.
- Spieksma, F.T.M. y Nikkels, A.H. 1999. Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergens in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy* 54: 235-241.
- Spieksma, F.T.M.; Nikkels, B.H. y Dijkman, J.H. 1995. Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clin. Exp. Allergy* 25: 234-239.

- Spieksma, F.T.M.; Nikkels, B.H. y Dukman, J.H. 1995. Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clinical and experimental allergy*. 25: 234-239
- Stach, A. 2003. The use of Hirst volumetric trap, preparation of drums and slides. *Postępi Dermatologii i Alergologii*. XX, 4: 246-249
- Starr, J.R. y Mason, B.J. 1966: The capture of airborne particles by water drops and simulated snow crystals. *Quarterly journal review meteorology association*, Imperial College Londonl. 92: 490-499
- Strasburger, E. 2004. Tratado de Botánica, 35a. ed. española. Ed. Marín. Barcelona.
- Suárez-Cervera M. y Seoane, J.A. 1983. Estudio del contenido polínico de la atmósfera de Barcelona según un nuevo método de filtración. *Collect. Bot.* 14: 587-615
- Suárez-Cervera, M. y Márquez, J. 1990. El polen y las esporas en el ambiente. En: Manual de aerobiología del País Vasco. Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Sanitaria y Edafología. Universidad de Barcelona. 148 pp.
- Suárez-Cervera, M. y Seoane-Camba, J.A. 2005. Biología celular del polen, origen y función de los alérgenos polínicos. Polinosis II: Polen y alergia. Laboratorios Menarini
- Suárez-Cervera, M.; Takahashi, Y.; Vega-Maray, A.M. y Seoane-Camba, J.A. 2003. Immunocytochemical localization of Cry j 1, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) in *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* (Cupressaceae) pollen grains. *Sex. Plant Reprod.* 16: 9-15.
- Suárez-Cervera, M.; Castells, T.; Vega-Maray, A.; Civantos, E.; del Pozo, V.; Fernández-González, D.; Moreno-Grau, S.; Moral, A.; López-Iglesias, C.; Lahoz, C. y Seoane-Camba, J.A. 2008. Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 101(1): 57-66.
- Suphioglu, C. 1998. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116: 253-260

- Takahashi, Y.; Nagoya, T.; Intuye, S.; Sakaguchi, M. y Karagiri, S. 1993. A new method of counting airborne Japanese cedar (*Criptomeria japonica*) pollen allergens by immunoblotting. *Allergy* 48: 94-98.
- Takahashi, Y.; OACI, T.; Nagoya, T.; Sakaguchi, M.; Yasueda, H. y Nitta, H. 2001. Possibility of real-time measurement of an airborne *Criptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of surface plasmon resonance. *Aerobiol.* 17: 313-318.
- Takahashi, Y.; Sakaguchi, M.; Inouye, S.; Miyazawa, H.; Imaoka, K. y Katagiri, S. 1991. Existence of exine free airborne allergen particles of Japanese cedar (*Criptomeria Japonica*) pollen. *Allergy* 46: 588-593.
- Tauber, H. 1974. A static non-overload pollen collector. *New Phytol.* 73: 359-369
- Teruel, C. 2006. El olivar de Murcia crece con calidad. *Revista Alcuza*. Noviembre-Diciembre: 32-34
- Thibaudon, M. y Sindt, C. 2008. Mesure des allergènes de pollens d'arbres dans l'air (bouleau, olivier). *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 48 (3): 179-186.
- Thommen, A.A. 1931. Hayfever. En: Coca AF, Walzer M, Thommen AA, eds. Asthma and Hayfever. In: Theory and Practice. Springfield IL: Charles C Thomas Publisher. 487-528.
- Tornero, P.; Herrero, T.; Ventas, P.; Rubio, M, Moreno. P. y del Barrio, M. 1990. Estudio de reactividad cruzada entre diversas oleáceas. *Rev Esp. Alergol Inmunol Clin.* 5, 1: 35-39.
- Universidad de Granada. 2009. Información aerobiológica. Visto última vez el 25-09-2009 en <http://www.ugr.es/~aerobio/olivo.htm>
- Valenta, R.; Duchene, M.; Ebner, C.; Valent, P.; Sillaber, C.; Deviller, P.; Ferreira, F.; Tejkl, M.; Edelmann, H.; Kraft, D. y Schneider, O. 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *Journal of Experimental Medicine* 175: 377-385.
- Valenta, R.; Duchene, M.; Pettenburger, K.; Sillaber, C.; Valent, P.; Bettelheim, P.; Breitenbach, M.; Rumpold, H.; Kraft, D. y Scheiner, O. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals, *Science* 253: 557-560.

- Valdés, B., Díez, M.J. y Fernández, I. (eds) 1987. Atlas polínico de Andalucía occidental. Instituto de desarrollo regional Nº 43. Universidad de Sevilla. Excelentísima diputación de Cádiz. España.
- Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753-765.
- Van Ree, R.; Cabanes-Macheteau, M.; Akkerdaas, J.; Milazzo, J.P.; Loutelier-Bourhis, C.; Rayon, C.; Villalba, M.; Koppelman, S.; Aalberse, R.; Rodriguez, R.; Faye, L. y Lerouge, P. 2000. Beta (1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem.* 275, 15: 11451-11458
- Vega-Maray, A.M.; Fernández-González, D.; Valencia-Barrera, R. y Suárez-Cervera, M. 2006. Detection and release of allergenic proteins in *Parietaria judaica* pollen grains. *Protoplasma* 2006; 228(1-3):115-20.
- Vinckier, S. y Smets, E. 2001. The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy* 36: 1129-1136.
- Wickman, M. 2005. When allergies complicate allergies. *Allergy* 60: 14-18 Suppl. 79.
- Williams, R.H.; Ward, E. y McCartney, A. 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *App. Environ. Microbiol.* 67: 2453-2459.
- Yli-Panula, E.; Takahashi, Y. y Rantio-Lehtimäki, A. 1997. Comparison of direct immunostaining and electroimmunoassay for analysis of airborne grass-pollen antigens. *Allergy* 52: 541-546.
- Zapata, C. 2003. Interpretación de los recuentos de pólenes. *Alergol Immunol Clin.* 18, (Extraordinario Núm.3):50-56
- Zaror, C.A. 2000. Introducción a la ingeniería ambiental para la industria de procesos. Universidad de Concepción. Chile
- Zhang, Z.; Zhe, J.; Chandra, S. y Hu, J. 2005. An electronic pollen detection method using Coulter counting principle. *Atmospheric Environment.* 39: 5446-5456

